

Fluoreszenzsonden zum selektiven Nachweis chelatisierbaren Eisens in Mitochondrien vitaler Zellen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Daniela Weisheit
aus Eisenach

Essen 2003

Referent:	Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. F. Bandermann
Tag der Disputation:	18. Juli 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis November 2002 im Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen sowie im Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen angefertigt. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann

für die Überlassung des interessanten Themas, die mir stets gewährte Unterstützung und die wertvollen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates, für die anregenden Diskussionsbeiträge und das Einverständnis zur Durchführung zahlreicher Experimente am Institut für Physiologische Chemie.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Institutes für Organische Chemie für die Kollegialität und das ausgezeichnete Arbeitsklima, insbesondere danke ich den Herren Dr. Wolfgang Radunz und Rouven Schmalz für ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie Herrn Dr. Hans-Gert Korth für die stets gewährte Hilfe.

Dank aussprechen möchte ich auch allen Mitgliedern des Institutes für Physiologische Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Kooperation. Sehr herzlich danken möchte ich vor allem Frau Priv.-Doz. Dr. Ursula Rauen für die intensive Betreuung und Herrn Dr. Frank Petrat für die vielen Hilfestellungen im Rahmen der Arbeiten am Institut für Physiologische Chemie.

Danken möchte ich zudem den Herren Heinz Bandmann und Werner Karow für die Anfertigung der NMR- bzw. Massenspektren sowie Herrn Willi Sicking für die Durchführung der Molecular-Modelling-Rechnungen.

Ganz besonderer Dank gilt Tobias Weimer und meinen Eltern Helmut und Monika Weisheit, die nicht nur durch ihre immerwährende Hilfsbereitschaft den Fortgang dieser Arbeit unterstützten.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen.....	2
1.2	Reaktive Sauerstoffspezies und katalytisch wirksame Metall-Ionen.....	7
1.3	Der zelluläre Eisenstoffwechsel.....	9
1.4	Chelatisierbares Eisen in Mitochondrien	15
1.5	Bestimmung des zellulären chelatisierbaren Eisens.....	20
1.6	Fluoreszenzmikroskopische Methoden zur Bestimmung chelatisierbaren Eisens.....	22
1.6.1	Fluoreszenz-Prozess und Fluoreszenzlöschung.....	23
1.6.2	Prinzip der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmungsmethode.....	27
1.6.3	Bekannte Fluoreszenzsonden zur Detektion chelatisierbaren Eisens in biologischen Systemen.....	30
2	Problemstellung	34
3	Entwicklung von Fluoreszenzsonden zum Nachweis chelatisierbaren Eisens in Mitochondrien	36
3.1	Die eisenchelatisierende Komponente	36
3.2	Die fluoreszenzgebende Komponente.....	38
3.3	Der Spacer	40
4	Synthesen von Fluoreszenzsonden zum Nachweis mitochondrialen chelatisierbaren Eisens	42
5	Untersuchung der potentiellen Fluoreszenzsonden im zellfreien System	54
5.1	Das Fluoreszenzverhalten in Ab- und Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen	54
5.2	<i>Ex situ</i> -Kalibrierungen	57
5.3	Untersuchungen zu biologisch relevanten Einflussfaktoren auf die Indikatorfluoreszenz	63
6	Einsatz der Fluoreszenzsonden im zellulären System.....	66
6.1	Die subzelluläre Verteilung der Fluoreszenzindikatoren.....	66
6.2	Detektion intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens	69
6.3	Intramitochondriale Konzentration chelatisierbaren Eisens	72

7	Anwendung in pathobiochemischen Fragestellungen.....	77
7.1	Synthese eines „Referenzfarbstoffes“	78
7.2	Untersuchung der Referenzsubstanz im zellfreien System	80
7.3	Untersuchung der Referenzsubstanz im zellulären System	82
7.4	Die Rolle mitochondrialen chelatisierbaren Eisens beim kälteinduzierten Zellschädigungsprozess	86
8	Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten.....	88
9	Zusammenfassung.....	90
10	Ausblick	93
11	Experimenteller Teil	96
11.1	Instrumentelle Analytik	96
11.2	Materialien zur Synthese	98
11.3	Trocknung der Lösungsmittel	99
11.4	Materialien für biologische Anwendungen	100
11.5	Versuchstiere.....	101
11.6	Synthese der Fluoreszenzindikatoren	102
11.6.1	5-Nitro-1,10-phenanthrolin (2).....	102
11.6.2	1,10-Phenanthrolin-5-amin (3)	103
11.6.3	2-Brom- <i>N</i> -(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (5)	104
11.6.4	Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (7).....	106
11.6.5	4-Brommethyl-benzoylbromid (8).....	109
11.6.6	4-(Brommethyl)- <i>N</i> -(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (10)	110
11.6.7	Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzyl- ester (11).....	112
11.6.8	4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (14)	115
11.6.9	2,2'-Bipyridin-4-amin (15).....	117
11.6.10	<i>N</i> -(2,2'-Bipyridin-4-yl)-4-(brommethyl)benzamid (16)	118
11.6.11	Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (17)..	120
11.6.12	4-(Brommethyl)- <i>N,N</i> -bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid Hydrobro- mid (19).....	123
11.6.13	4-(Brommethyl)- <i>N,N</i> -bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid (19a).....	126

11.6.14	Rhodamin B-4-[bis(pyridin-2-yl-methyl)aminocarbonyl]benzylester (20).....	127
11.6.15	2-Brom- <i>N,N</i> -bis(pyridin-2-yl-methyl)acetamid (21).....	128
11.6.16	Rhodamin B-[(bis(pyridin-2-yl-methyl)aminocarbonyl)methylester (22).....	130
11.6.17	Rhodamin B-[<i>N,N</i> -bis(pyridin-2-yl-methyl)]amid (24).....	131
11.6.18	9-Nitrophenanthren (26).....	132
11.6.19	9-Phenanthryl-amin (27)	133
11.6.20	4-(Brommethyl)- <i>N</i> -9-phenanthryl-benzamid (28).....	135
11.6.21	Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (29)..	137
11.7	Untersuchung der Fluoreszenzsonden im zellfreien System.....	140
11.7.1	Reduktion der Schwermetallkontamination verwendeter Medien.....	140
11.7.2	Analyse des Fluoreszenzverhaltens in An- und Abwesenheit von Fe ²⁺ -Ionen	141
11.7.3	<i>Ex situ</i> -Kalibrierungen	142
11.7.4	Untersuchungen zu biologisch relevanten Einflussfaktoren auf die Indikatorfluoreszenz	143
11.8	Anwendung der Fluoreszenzsonden im zellulären System	144
11.8.1	Zellpräparation und Zellkultivierung	144
11.8.1.1	Präparation und Kultivierung von Rattenhepatozyten	144
11.8.1.2	Kultivierung der Rattenleberendothelzellen.....	145
11.8.2	Die subzelluläre Verteilung der Fluoreszenzindikatoren	145
11.8.3	Detektion intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens	146
11.8.4	Quantifizierung intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens	148
11.9	Die Referenzsubstanz im zellfreien System	149
11.10	Die Referenzsubstanz im zellulären System	150
11.11	Die Rolle mitochondrialen chelatisierbaren Eisens bei kälteinduzierter Zellschädigung	151
11.12	Untersuchungen zur Zellvitalität	152
11.13	Quantenausbeutebestimmung.....	153
11.14	Statistische Auswertung	153
11.15	Abkürzungsverzeichnis.....	154
12	Literatur.....	156

1 EINLEITUNG

Eisen ist mit einem durchschnittlichen Anteil von $5 \cdot 10^4$ ppm das vierthäufigste Element der Erdkruste und das mengenmäßig häufigste Spurenelement im zellulären Metabolismus des Menschen.^[1] Obwohl Eisen für alle Eukaryonten und die weitaus meisten Prokaryonten ein essentielles Element darstellt, besitzt es dennoch auch ein erhebliches cytotoxisches Potential. Eisenionen haben die Fähigkeit, die Bildung hochreaktiver Sauerstoffspezies wie das Hydroxylradikal aus weniger reaktiven Verbindungen wie z. B. Wasserstoffperoxid zu katalysieren. Der überwiegende Anteil des Eisens in der Zelle wird daher in dem Eisenspeicherprotein Ferritin in redox-inaktiver Form gespeichert. Ein geringer Teil des Eisens bildet jedoch einen sogenannten „Übergangspool“, in dem das Eisen an niedermolekulare Liganden gebunden und weitgehend in redox-aktiver Form vorliegt. Dieser relativ kleine Eisenpool (etwa 1 % des zellulären Gesamteisengehaltes)^[2-8] wird als ein entscheidender Faktor in der Pathogenese verschiedener Formen der Zellschädigung angesehen.

Bislang wurde - vorwiegend aufgrund unzureichender Nachweisverfahren - nahezu ausschließlich das gesamtzelluläre oder das cytosolische chelatisierbare Eisen untersucht,^[9-10] obwohl die Mitochondrien einerseits als zelluläre Hauptquelle reaktiver Sauerstoffspezies gelten, andererseits auch leicht durch diese geschädigt werden und aus diesem Grund das redox-aktive Eisen hier eine besondere Bedeutung besitzen sollte. So wird beispielsweise bei verschiedenen Krankheiten eine Eisen-vermittelte intramitochondriale Bildung von Hydroxylradikalen diskutiert.^[12] Durch die Einführung von in vitalen Zellen anwendbaren fluoreszenzmikroskopischen Verfahren wurde in den letzten Jahren eine deutlich verbesserte Möglichkeit zur Charakterisierung des chelatisierbaren Eisens gefunden.^[6, 7, 13] Basierend auf diesen Nachweisverfahren sind das Design, die Synthese sowie biologische Anwendung spezifischer Fluoreszenzindikatoren zur selektiven Untersuchung des chelatisierbaren Eisenpools in Mitochondrien intakter Zellen Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen

In den letzten zwanzig Jahren sind viele Krankheitsbilder als Folge der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erkannt worden.^[12, 14-17] Beispiele hierfür sind Ischämie-Reperfusionsschäden, akute und chronische Entzündungszustände sowie verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und die Friedreich-Ataxie.

Obwohl Sauerstoff für alle aeroben Organismen ein lebensnotwendiges Element darstellt, ist der molekulare Sauerstoff selbst und sind insbesondere die daraus gebildeten sogenannten „reaktiven Sauerstoffspezies“ (*reactive oxygen species*, ROS) imstande, nahezu alle Biomoleküle zu oxidieren und damit funktionell massiv zu beeinträchtigen. Vor allem bei hohen Bildungsraten sind reaktive Sauerstoffspezies gefährlich für den lebenden Organismus bzw. schädigen seine Zellbestandteile. In moderaten Konzentrationen besitzen sie dagegen durchaus eine große Bedeutung in vielen zellregulatorischen Prozessen. Wichtige, unter Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies ablaufende, physiologische Funktionen sind beispielsweise die intrazelluläre Signal-Transduktion (z. B. Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B), die Regulation der Erythropoietin-Produktion und anderer Hypoxie-induzierter Faktoren sowie die Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase.^[16]

Zu den biologisch bedeutsamsten Sauerstoffspezies zählen das Superoxid-Radikalanion $O_2^{\cdot-}$, Wasserstoffperoxid H_2O_2 , das Hydroxylradikal $\cdot OH$ und Singulett-Sauerstoff 1O_2 . Abbildung 1 zeigt ein vereinfachtes Schema zum Zusammenhang zwischen Bildung und Abbau dieser wichtigen reaktiven Sauerstoffspezies.

Auf die gleichfalls im Sauerstoffmetabolismus involvierten und nicht minder wichtigen reaktiven Stickstoffspezies wie beispielsweise Stickstoffmonoxid $NO\cdot$ oder Peroxynitrit $ONOO^-$ soll im Rahmen dieser Betrachtungen nicht näher eingegangen werden.

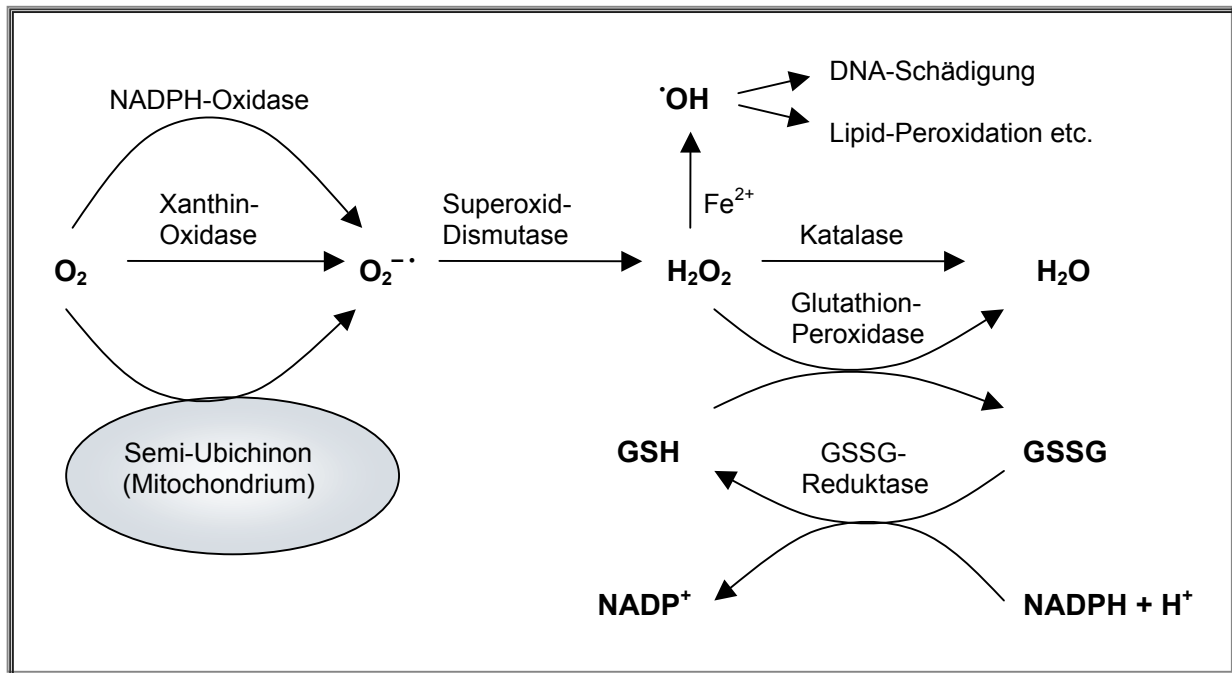


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur Entstehung und zum Abbau wichtiger reaktiver Sauerstoffspezies im biologischen System.

Das Superoxid-Radikalanion $O_2^{\cdot-}$ entsteht durch Ein-Elektronen-Reduktion des Sauerstoffmoleküls im Grundzustand (3O_2). Dieser Prozess wird durch Enzyme wie NADPH-Oxidase (NADPH: Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat/reduzierte Form) und Xanthin-Oxidase oder nicht-enzymatisch durch redox-aktive Substanzen wie die Semiubichinon-Verbindung der mitochondrialen Atmungskette vermittelt,^[18] wobei die mitochondriale Atmungskette in den meisten Zellen die wichtigste Quelle von $O_2^{\cdot-}$ darstellt.^[19] In Granulozyten stellt überraschenderweise die Bildung der potentiell schädigenden Superoxid-Radikalanionen im Verlauf des sogenannten *respiratory burst* einen für den Organismus positiven Prozess dar. Diese zu den Leukozyten gehörenden Blutzellen verwenden die membrangebundenen Enzymkomplexe der NADPH-Oxidase zur Katalyse des Transfers eines einzelnen Elektrons von cytosolischem NADPH auf extrazellulären Sauerstoff und erzeugen so gezielt Superoxid-Radikalanionen zur Abwehr von Bakterien.^[20] Im Allgemeinen benötigt der Organismus jedoch ein gezielt wirkendes Entgiftungssystem für $O_2^{\cdot-}$. So wandeln Superoxid-Dismutasen (SODs) $O_2^{\cdot-}$ enzymatisch in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff um ($2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$).^[21] Neben dem direkten Elektronentransfer durch Enzymkatalyse tritt in biologischen Systemen in geringem Maße auch

die nicht-enzymatische Disproportionierung^A (Dismutation) von Superoxid-Radikal-anionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid auf.^[22] In Gegenwart von Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} oder Cu^+ kann nun Wasserstoffperoxid in das hochreaktive Hydroxylradikal umgewandelt werden (siehe Kapitel 1.2), das seinerseits Radikal-Kettenreaktionen wie die Lipidperoxidation initiieren kann, aus denen wiederum eine Reihe organischer Sauerstoffradikale hervorgehen. Alternativ wird Wasserstoffperoxid durch das Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$) oder durch Glutathion-Peroxidase ausschließlich zu Wasser umgesetzt. Während der Glutathion-Peroxidase-Reaktion wird Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert, das mit Hilfe der Glutathion-Reduktase in einem NADPH-verbrauchenden Prozess wieder zu Glutathion reduziert wird.

Die Bildung von Singulett-Sauerstoff, der elektronisch angeregten Form des Sauerstoffmoleküls,^B wird einer Vielzahl biochemischer Reaktionen zugeschrieben, wie dem Peroxidase-katalysierten Abbau carcinogener *N*-Nitrosamine.^[23] Die meisten der beschriebenen Bildungswege im biologischen System sind jedoch umstritten, wobei in diesem Zusammenhang auf die besondere Schwierigkeit der eindeutigen Identifizierung^C von $^1\text{O}_2$ hingewiesen sei.^[24]

^A Das Produkt der nicht-enzymatischen Disproportionierung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ ist vermutlich nicht Singulett-Sauerstoff, da die bei physiologischem pH angenommene Reaktionsabfolge lautet: $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HO}_2^{\cdot}$ / $\text{HO}_2^{\cdot} + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Für die Gleichgewichtsreaktion $\text{HO}_2^{\cdot} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{O}_2^{\cdot-}$ in wässriger Lösung wird ein pK_a von 4.8 angegeben. Die Geschwindigkeitskonstante der spontanen Disproportionierung bzw. des Zerfalls von $\text{HO}_2^{\cdot}/\text{O}_2^{\cdot-}$ (2. Ordnung) hat unter physiologischen Bedingungen einen Wert von $\sim 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Enzym-katalysierte Dismutation verläuft damit etwa 10^6 mal schneller als die Spontanreaktion.^[25]

^B Die beiden energieärmsten Formen des Singulett-Sauerstoffs sind $^1\Delta_g\text{O}_2$ mit einer relativen Energie von 22.4 kcal/mol gegenüber Sauerstoff im Grundzustand ($^3\Sigma_g^-\text{O}_2$) und $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ mit einer Energie von 37.5 kcal/mol über dem Grundzustand. Der Singulettzustand $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$ hat unter biologischem Aspekt jedoch keine Bedeutung. $^1\text{O}_2$ besitzt im Gegensatz zu Sauerstoff im Grundzustand π^* -Elektronen mit antiparallelem Spin; daher sind seine Reaktionen mit anderen Molekülen im Grundzustand nicht „spin-verboden“ und seine Reaktivität ist im Vergleich zu $^3\text{O}_2$ stark erhöht.

^C Die physikalische Umwandlung von $^1\text{O}_2$ in $^3\text{O}_2$ verläuft durch die monomolekulare Reaktion $^1\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2 + h\nu$ ($\lambda_{\text{em, max}} = 1270 \text{ nm}$) oder die bimolekulare Reaktion $^1\text{O}_2 + ^1\text{O}_2 \rightarrow 2 ^3\text{O}_2 + h\nu$ ($\lambda_{\text{em, max}}$ bei 608 nm und 703 nm). Die klaren Lumineszenzemissionen werden jedoch nur in sehr einfachen Experimenten detektiert. In komplexen Systemen führt z. B. die Anwesenheit von Tryptophan oder Serumalbumin zur Verschiebung des Emissionsspektrums von $^1\text{O}_2$; andere Moleküle, sogenannte „Singulettquencher“ wie Histidin, können die Lichtemission stark herabsetzen oder vollständig unterdrücken.

Auch der Nachweis von Singulett-Sauerstoff unter Verwendung von „ $^1\text{O}_2$ -Fängern“ ist nicht eindeutig.

Die genannten Sauerstoffspezies unterscheiden sich stark in ihrer Reaktivität: Während das Superoxid-Radikalanion und das aus $O_2^{\cdot -}$ entstehende Wasserstoffperoxid relativ wenig reaktiv sind, ist das Hydroxylradikal außerordentlich reaktiv - es reagiert nahezu diffusionskontrolliert^D praktisch mit allen an seinem Bildungsort verfügbaren Molekülen, eingeschlossen Lipide, Nukleinsäuren, Proteine und Zucker.^[26, 27] Auch Singulett-Sauerstoff reagiert wie das Hydroxylradikal mit den meisten organischen Verbindungen, wenn auch meist mit kleineren Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich zu Reaktionen mit $\cdot OH$.

An diesem Punkt sei kurz auf die Schädigungswirkung von $\cdot OH$ eingegangen. Wie bereits erwähnt, hängt die Art der durch Hydroxylradikale hervorgerufenen Schädigung entscheidend vom Entstehungsort des Radikals ab, so führt die $\cdot OH$ -Bildung in räumlicher Nähe zur DNA (Desoxyribonukleinsäure) zu Modifikationen von Purinen und Pyrimidinen. Oxidative Modifikationen der Zuckerkomponenten (Desoxyribosen) führen häufig zu Strangbrüchen und eine oxidative Veränderung der verschiedenen Basen hat meist Fehlpaarungen zur Folge, die unter Umständen in Punktmutationen resultieren. Reaktionen von $\cdot OH$ beispielsweise mit den Methionin-, Histidin- und Tryptophanresten der Proteine können beachtliche Veränderungen der biologischen Aktivität der entsprechenden Enzyme nach sich ziehen.

Besonders gut ist jedoch die Schädigungswirkung des Hydroxylradikals *in vivo* auf Membranlipide untersucht. Lipide sind essentieller Bestandteil aller zellulärer Membranen. Speziell die mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden leicht durch die als Lipidperoxidation bezeichnete Reaktion modifiziert und sind damit prädestiniert für oxidative Angriffe. Die Membranen der tierischen Zelle enthalten z. B. Phospholipide wie Lecithin (O-Phosphatidylcholin), das verschiedene gesättigte und ungesättigte Fettsäuren enthalten kann, u. a. Stearin- (C_{18} , gesättigt), Öl- (C_{18} , eine Doppelbindung), Linol- (C_{18} , zwei Doppelbindungen) und Linolensäure (C_{18} , drei Doppelbindungen). Die Oxidation dieser Fettsäuren führt zu verschiedenen Abbauprodukten, wie kurzkettigen Alkoholen, Aldehyden und Alkanen. Unter bestimmten oxidativen Bedingungen lässt sich so beispielsweise Malondialdehyd und damit indirekt eine Lipidperoxidation mittels der sogenannten „Thiobarbitursäure-Reaktion“ nachweisen.

^D d. h. mit Geschwindigkeitskonstanten $k \geq 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [28]

Abbildung 2 zeigt in vereinfachter Form den typischen Verlauf eines oxidativen Abbaus einer dreifach ungesättigten Fettsäure nach dem Angriff durch Hydroxylradikale.

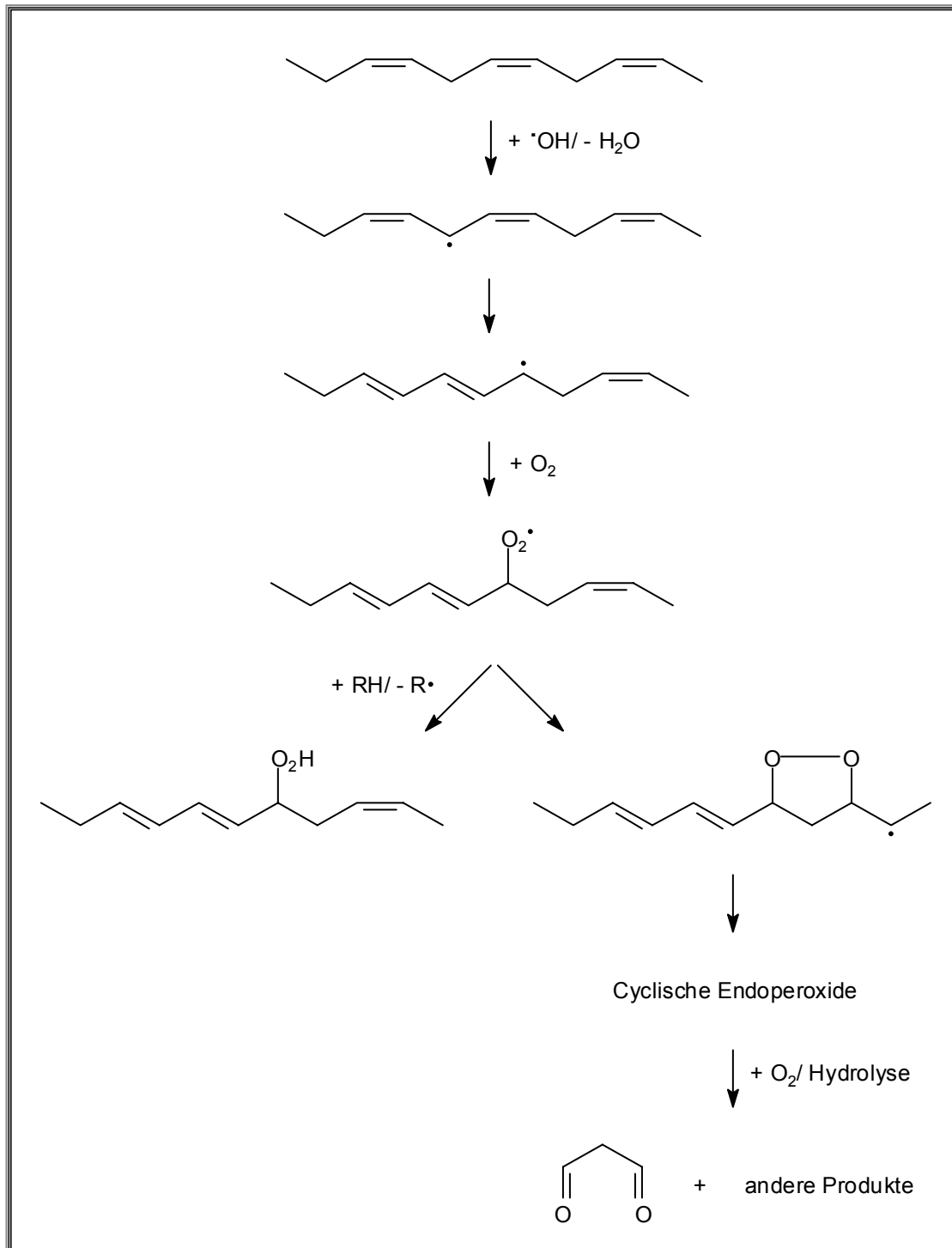


Abbildung 2: Vereinfachter Mechanismus der Hydroxylradikal-vermittelten Oxidation ungesättigter Fettsäuren.^[27]

In der dargestellten Reaktionsabfolge ist vor allem die Bildung des Peroxylradikals ROO^\bullet von großer Bedeutung, da es befähigt ist, wiederum durch H-Abstraktion von weiteren Lipidmolekülen eine Radikal-Kettenreaktion in Gang zu setzen.

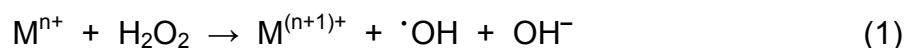
Zum Schutz vor oxidativen Zellschäden verfügt der Organismus über eine antioxidative Strategie, die enzymatische sowie nicht-enzymatische Schutzsysteme beinhaltet. Sie umfasst verschiedene Aktivitäten zur Entfernung potentiell toxischer Sauerstoffspezies und ihrer Derivate auf verschiedenen Stufen ihrer Entstehung oder zur Blockierung ihrer Reaktionen mit Biomolekülen.^[29] Zu ihnen zählen:

- kleine Moleküle, die als Radikalfänger fungieren, wie α -Tocopherol (Vitamin E) oder Ascorbinsäure (Vitamin C),
- Enzyme, die mit bestimmten Sauerstoffspezies reagieren und diese in weniger toxische Verbindungen überführen, wie die bereits erwähnten Superoxid-Dismutasen oder Katalasen,
- Rekonstitutionssysteme, die Radikalfänger reaktivieren, wie Glutathion-Reduktase,
- Reparatursysteme, die nach vollzogener Schädigung die Schadstellen reorganisieren („reparieren“) und geschädigte Moleküle entfernen, wie die Enzyme der DNA-Reparatur.

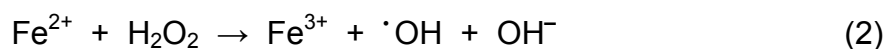
Dennoch bewahren auch diese Schutz- und Reparaturmechanismen nicht immer vor auftretenden Überschussreaktionen oder unerwünschten Nebenreaktionen.

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und katalytisch wirksame Metall-Ionen

Die meisten der *in vivo* generierten $^\bullet\text{OH}$ -Radikale entstehen durch die Metall-katalysierte Zersetzung von Wasserstoffperoxid:



Trotz der viel diskutierten Wirkung anderer Metall-Ionen (hauptsächlich Cu^+ , aber auch Ti^{3+} , Co^{2+} u. a.) tritt in biologischen Systemen sicherlich überwiegend die Fe^{2+} -abhängige Bildung von Hydroxylradikalen auf, die „Fenton-Reaktion“.^[30]



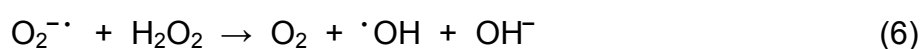
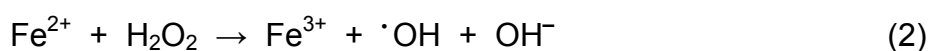
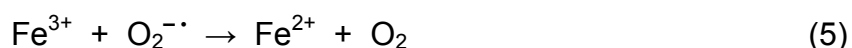
In manchen Überlegungen wird nicht die Produktion von Hydroxylradikalen während der Fenton-Reaktion angenommen, sondern es werden sogenannte Ferryl-Spezies ($\text{Fe}=\text{O}^{2+}$) postuliert - Eisen-Sauerstoff-Komplexe, in denen Eisen die Oxidationsstufe +4 annimmt:^[31, 32]



Wasserstoffperoxid reagiert nach Zugabe von Fe^{2+} in Form des Fe^{2+} -EDTA-Komplexes gleichfalls unter Hydroxylradikal-Bildung, vermutlich auch hier über Ferryl-Spezies als Zwischenstufe:^[27]



Auch das Superoxid-Radikalanion ist an der $\cdot\text{OH}$ -Bildung *in vivo* beteiligt: Die „Haber-Weiss-Reaktion“ (6) ergibt sich als Netto-Gleichung der Prozesse (5) und (2):

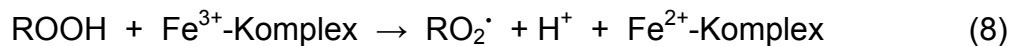


Rigo *et al.*^[33] und andere Arbeitsgruppen^[34-36] konnten zeigen, dass die nicht-eisenvermittelte Reaktion (6) alleine praktisch nicht abläuft.^E

Die Toxizität der unter physiologischen Bedingungen relativ schwach reaktiven Verbindungen $\text{O}_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 wird damit vornehmlich auf eine eisenkatalysierte Umwandlung in das hochreaktive $\cdot\text{OH}$ zurückgeführt.^[9] In Gegenargumentationen wird u. a. betont, dass die Schädigung von Biomolekülen, z. B. durch Lipidperoxidation, nicht in jedem Fall durch zugesetzte $\cdot\text{OH}$ -Radikal-Fänger unterbunden werden kann.^[37] Halliwell und Gutteridge^[9] erklären diesen Umstand jedoch durch die diffusionskontrollierte Abreaktion der Hydroxylradikale. Ein Radikal-Fänger kann nicht in der Lage sein, direkt am Entstehungsort von $\cdot\text{OH}$ in so hoher Konzentration vorzuliegen, dass er eine oxidative Schädigung durch $\cdot\text{OH}$ vollständig zu verhindern vermag. Viele der typischen Radikal-Fänger wie Mannit oder

^E In den genannten Literaturstellen wurden für die Reaktion (6) unter physiologischen Bedingungen Geschwindigkeitskonstanten von $k \leq 5 \times 10^{-3}$ bis $2.25 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Damit ist ersichtlich, dass die unkatalysierte Reaktion von Superoxid-Radikalanionen mit Wasserstoffperoxid im Vergleich zur Dismutation von $\text{HO}_2^{\cdot}/\text{O}_2^{\cdot-}$ zu langsam ist, um von Bedeutung zu sein.

Thioharnstoff haben des weiteren eine gewisse eisenbindende Kapazität, die ihre Schutzwirkung gleichfalls erklären kann. Allerdings ist es sehr überraschend, dass ebenso ein Zusatz von Katalase die Lipidperoxidation nicht in jedem Falle inhibieren kann. Auch dieser Umstand kann dem Eisen zugeschrieben werden. Aus Studien zur Kinetik von mikrosomalen oder liposomalen Lipidperoxidationen in Gegenwart von Fe^{2+} - und/ oder Fe^{3+} -Salzen schlossen Aust *et al.*^[38], dass diese Kettenreaktion auch durch einen $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Sauerstoffkomplex in Gang gebracht werden kann. Eisen spielt im Verlauf der Lipidhydroperoxidation noch eine weitere Rolle. So wird die Zersetzung von Lipidperoxiden bei physiologischen Temperaturen durch die Anwesenheit von Übergangsmetallionen in Form von Eisen- oder Kupfersalzen stark beschleunigt. Es treten u. a. folgende Reaktionen auf:



Weitere Bestätigung für den erheblichen Einfluss von Eisenionen bei oxidativen Schädigungsprozessen liefert die protektive Wirkung, die eine Behandlung von Zellen mit Eisenchelatoren zeigt. In zahlreichen Studien zu verschiedenen Zellschädigungsmodellen konnte so die Toxizität von H_2O_2 durch die Zugabe von Eisenkomplexbildnern wie 2,2'-Dipyridyl, 1,10-Phenanthrolin oder Desferrioxamin stark herabgesetzt werden.^[39, 40]

1.3 Der zelluläre Eisenstoffwechsel

Eisen, das zu den Übergangsmetallen gehörende Element mit der Ordnungszahl 26 im Periodensystem, ist das sechsthäufigste Element im Universum und das vierthäufigste in der Erdkruste. Nach der Theorie von G. Wächtershäuser^[41-43] zur chemoautotrophen Entwicklung von organischem Leben hat Eisen in Form von Pyrit (FeS_2) evtl. sogar die entscheidende katalytische Rolle bei der initialen Bildung von C-C-Bindungen aus Kohlenstoffdioxid gespielt. Eisen liegt bei neutralem pH-Wert in wässriger Lösung im Wesentlichen in der Oxidationsstufe Fe^{3+} (d^5) vor, bei Anwesenheit von Reduktionsmitteln dominiert Fe^{2+} (d^6). Diese Eisenionen bilden mit koordinierenden Liganden zahlreiche Komplexe mit der maximalen Koordinationszahl von 6 aus. In wässrigen Systemen sind diese Fe^{2+} - und die Fe^{3+} -Komplexe

leicht zu Elektronentransfer-Reaktionen oder Säure-Base-Reaktionen fähig,^F was ihre überaus große Bedeutung in biologischen Systemen erklärt.

Mit Ausnahme von einigen Mikroorganismen (z. B. *Laktobacillus planarum*) ist Eisen ein essentielles Spurenelement für jede Lebensform. In frühen Phasen der Evolution, in Abwesenheit von Sauerstoff in der Erdatmosphäre, lag Eisen in wässriger Lösung als hydratisiertes $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ vor. Nach Erscheinen von molekularem Sauerstoff änderte sich die Situation mit der Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} . Bei neutralem pH-Wert ist dreiwertiges Eisen in wässriger Lösung praktisch unlöslich (Löslichkeitsprodukt von $\text{Fe}(\text{OH})_3$: $K_{\text{S0}} = 10^{-36.85} \text{ mol}^{-2} \text{ L}^{-2}$),^[44] so dass Mikroorganismen und Pflanzen große Anstrengungen unternehmen mussten, um Eisen überhaupt bioverfügbar zu machen. Dies geschah durch die Entwicklung einer Reihe von sehr spezifischen und starken Eisenchelatoren (Siderophore), die in der eisenfreien Apo-Form sezerniert und als eisenbeladenes Siderophor reabsorbiert werden können. Im Falle des Desferrioxamins (Desferal[®], $\log \beta (\text{Fe}^{3+}) = 30.6$ und $\log \beta (\text{Fe}^{2+}) = 10.3$ ^G für Ferrioxamin B)^[45] hat ein solches Siderophor als eisenbindendes Medikament bei bestimmten Formen humaner Eisenspeicherkrankheiten Eingang in die Medizin gefunden.

Der Mensch ist wie andere mehrzellige Organismen auf eine adäquate Zufuhr von Eisen über die Nahrung angewiesen. Ein prinzipielles Problem besteht hier in der relativ ineffektiven intestinalen Eisenabsorption des Menschen. Dabei spielt die geringe Löslichkeit von anorganischen Eisenkomplexen ebenso eine Rolle wie die eindeutige Präferenz der intestinalen Schleimhaut für Fe^{2+} gegenüber Fe^{3+} . Dies hat zur Folge, dass die Eisenbioverfügbarkeit aus pflanzlicher Nahrung relativ gering ist. Da in der „Dritten Welt“ überwiegend eine rein pflanzliche Ernährung vorherrscht, stellt der Eisenmangel weltweit die häufigste Mangelkrankheit dar.^[46]

Eisen ist das mengenmäßig häufigste essentielle Spurenelement im zellulären Metabolismus des Menschen. So enthält der menschliche Körper 4 - 5 g Eisen, wobei rund 70 % davon im Hämoglobin enthalten sind, etwa 19 % als „Speicher“- bzw. „Depoteisen“ in Form der Eisenspeicherproteine Ferritin und Hämosiderin - vor

^F Die $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Redoxpotentiale verschiedener Eisenkomplexe bei pH = 7 variieren von etwa - 0.75 bis 1.15 V.^[47]

^G Die Bruttokomplexbildungskonstante $\log \beta$ für einen Fe^{n+} -Komplex unter Verwendung hexadentater Liganden ist gegeben durch $\beta = \frac{\text{FeL}^{3+}}{[\text{Fe}^{3+}][\text{L}]}$.

allem in Leber und Milz - abgelagert und circa 11 % als „Funktionseisen“ in Myoglobin oder eisenhaltige zelluläre Enzyme wie Cytochrome, Dioxygenasen, Hydroxylasen, Peroxidasen, Katalasen u. a. eingebaut werden. Etwa 0.1 % liegen im humanen Serum als an das Transportprotein Transferrin gebundenes Fe^{3+} vor.^[48] Apo-Transferrin enthält bei einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa zwei Fe^{3+} -Bindungsstellen pro Molekül und besitzt mit einer Bruttokomplexbildungskonstanten von $\log K = 21$ eine hohe Affinität für Fe^{3+} -Ionen (Abbildung 3).^[49] Unter physiologischen Bedingungen liegt die Eisensättigung des Transferrins bei 30 %.

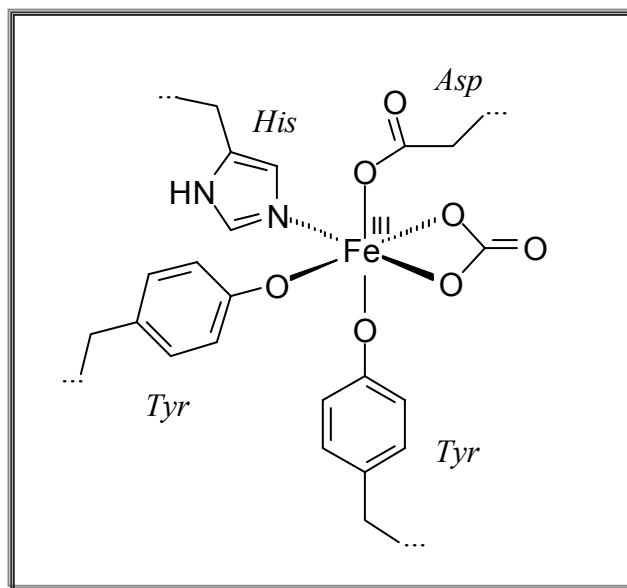


Abbildung 3: Aufbau einer Eisen-Bindungsstelle im Laktotransferrin^[49] (Asp: Asparaginsäure-, His: Histidin-, Tyr: Tyrosin-Rest).

Die Aufnahme Transferrin-gebundener Eisenionen in die Zelle erfolgt durch rezeptor-vermittelte Endozytose (Abbildung 4). Dabei bindet das mit Eisenionen beladene Transferrinmolekül spezifisch an den Transferrinrezeptor auf der Zelloberfläche und wird als Transferrin/Rezeptor-Komplex unter Ausbildung eines Endosoms in das Zellinnere aufgenommen. Im Inneren des Endosoms wird der pH-Wert durch ATP-abhängige (ATP: Adenosintriphosphat) Protonenpumpen abgesenkt, wodurch die Affinität des Transferrins für Fe^{3+} abnimmt. Beide Fe^{3+} -Ionen werden schließlich in das zelluläre Cytosol freigesetzt. Der Transferrinrezeptor und das Apo-Transferrin werden über Exozytose erneut bereitgestellt.^[50-53]

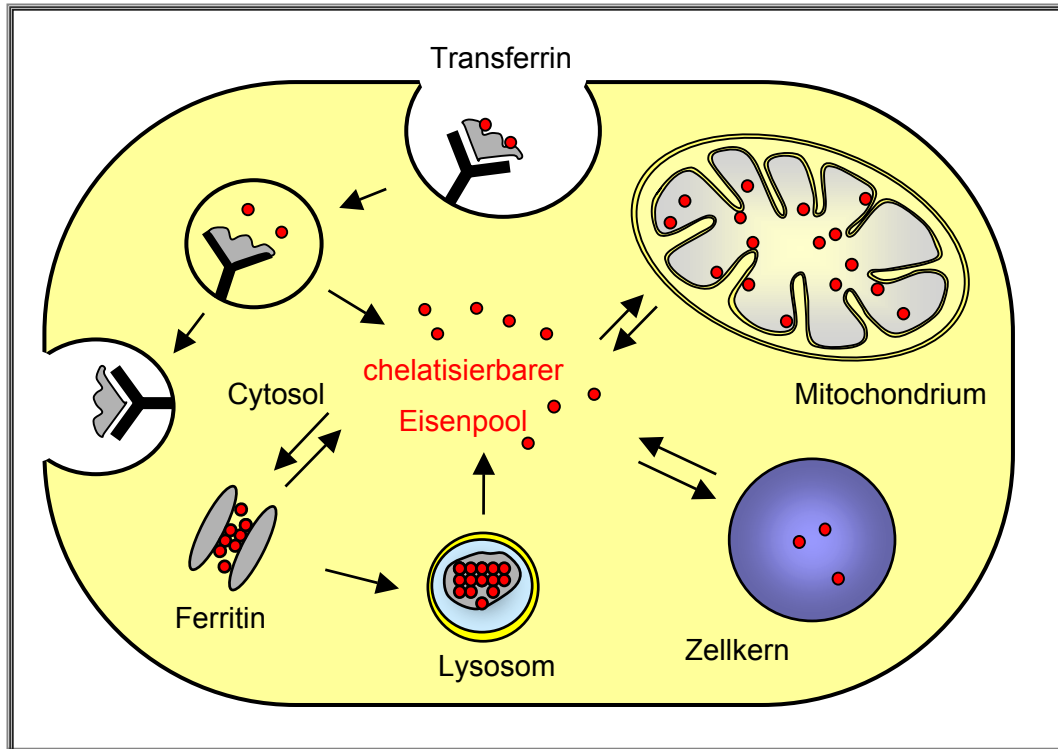


Abbildung 4: Die zelluläre Eisenhomöostase (Details im Text).

Das in das Cytosol freigesetzte Eisen durchläuft - der allgemeinen Vorstellung entsprechend - zunächst einen sogenannten Übergangspool, in dem die Eisenionen an niedermolekulare organische Chelatoren (z. B. Citrat, ADP oder ATP) mit relativ kleinen Komplexbildungskonstanten gebunden vorliegen. Dieser Eisenpool wird in einer Größenordnung von etwa 1 % des zellulären Gesamteisens beschrieben.^[2-8] In der Literatur wird mehrheitlich angenommen, dass es sich bei diesem Eisen um die reduzierte Form Fe^{2+} handelt.^[6, 7, 54, 55] Dieser Oxidationszustand lässt sich auf die Gegenwart hoher Konzentrationen an reduzierenden Agenzien wie Ascorbinsäure (2.0 mM)^[56] oder Glutathion (4.5 mM)^[57] im Cytosol und anderen Zellkompartimenten zurückführen. Aufgrund der genannten Charakteristika werden die Eisenionen des skizzierten Übergangspools alternativ auch als „freies“, „labiles“, „niedermolekulares“ oder „redox-aktives“ Eisen bezeichnet. Letztendlich umfassen alle diese Begriffe nur mehr oder minder große Teile des Übergangspools und sind nicht vollkommen deckungsgleich. Im Folgenden wird der Ausdruck „chelatisierbar“ verwendet, da die Charakterisierung dieses Eisens methodisch bedingt am besten durch eisenchelatisierende Detektormoleküle realisiert werden kann (s.u.).

Der größte Anteil des aus den Endosomen freigesetzten Eisens wird umgehend in Ferritin und eisenenthaltende Funktionsproteine eingebaut. Ferritin besitzt ein Molekulargewicht von ~450 kDa und wurde in nahezu allen Lebensformen nachgewiesen. Es liegt vorwiegend intrazellulär (im Cytosol), aber auch im Serum vor. Hämosiderin ist in Form unlöslicher Aggregate in Lysosomen zu finden. Sowohl Ferritin als auch das aus ihm hervorgehende Hämosiderin besitzen einen anorganischen Kern aus hydratisiertem Fe_2O_3 . Im Ferritin wurde für diesen Kern eine annähernde Zusammensetzung von $[(\text{FeOOH})_8 \cdot (\text{FeOPO}_3\text{H}_2)]$ gefunden, in der die Fe^{3+} -Ionen in oktaedrischer Umgebung über Oxo- und Hydroxo-Brücken verbunden vorliegen.^[58, 59] Die Wechselwirkung des Eisens mit Ferritin initiiert zunächst eine Anbindung von Fe^{2+} -Ionen an eine spezifische Eisenbindungsstelle, das Ferroxidase-Zentrum. In diesem Zentrum erfolgt nunmehr die Interaktion mit Sauerstoff, Fe^{2+} wird zu Fe^{3+} oxidiert, wechselt anschließend in die Kavität und aggregiert dort, um den Eisenkern auszubilden.^[60, 61] Ein Molekül Ferritin kann bis zu 4500 Eisenionen enthalten. Normalerweise liegt eine Sättigung von nur 20 % vor.^[1]

Obwohl die meisten Autoren bislang lediglich von einem cytosolischen Übergangspool chelatisierbaren Eisens ausgingen,^[9, 10] erfordern zahlreiche indirekte Hinweise die Existenz eines solchen Pools auch in anderen Zellkompartimenten. So erfolgt der Einbau von Fe^{2+} in Protoporphyrin IX durch Ferrochelatase als letzter Schritt der Häm synthese und der Einbau von Fe^{2+} in eisenhaltige mitochondriale Proteine (Fe/S-Cluster) innerhalb der mitochondrialen Matrix. Der intralysosomale Abbau von Metalloproteinen (z. B. Ferritin zu Hämosiderin) spricht für einen vorhandenen Eisenpool in den Lysosomen.^[62] Des weiteren lässt der Nachweis eisenabhängiger, Hydroxylradikal-vermittelter Schädigungen der DNA, die aufgrund der praktisch diffusionskontrollierten Reaktionen von $\cdot\text{OH}$ bekanntlich nur durch DNA-assoziiertes Eisen erklärbar sind,^[9] Rückschlüsse auf einen nukleären chelatisierbaren Eisenpool zu, ebenso wie Schädigungen der mitochondrialen DNA auf einen chelatisierbaren Eisenpool in Mitochondrien hinweisen.

Es wird angenommen, dass ausgehend vom cytosolischen Übergangspool chelatisierbaren Eisens auch ein Transport in die einzelnen Zellkompartimente erfolgt, die ihrerseits wiederum über einen Pool chelatisierbaren Eisens verfügen. Dieser intrazelluläre Übergangspool muss damit als dynamisches Gleichgewicht angesehen werden, das ständig durch den Einbau und die Wiederfreisetzung von Eisen in und aus den Speicherproteine(n) beeinflusst wird.

Die angesprochenen Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies bzw. ihre eisenkatalysierte Bildung können im wesentlichen auf das chelatisierbare Eisen zurückgeführt werden. Katalytisch aktiv sind in diesen Reaktionen folglich vor allem die durch niedermolekulare Liganden komplexierten oder locker an Proteine, DNA oder Membranen assoziierten Eisenionen, die eine Fenton-Chemie erlauben und somit Lipidperoxidationen initiieren - nicht jedoch das Eisen der Funktions- (Hämoglobin, Enzyme), Transport- (Transferrin) oder Speicherproteine (Ferritin, Hämosiderin). Das cytotoxische Potential des Eisens bezieht sich damit auf das chelatisierbare Eisen, das sowohl zellulär als auch unter pathologischen Bedingungen extrazellulär vorkommt.^[11]

Durch einen erhöhten Eisenverbrauch oder eine unzureichende Eisenaufnahme kann es zu einem intrazellulären Eisenmangel und zur Abnahme der Konzentration chelatisierbaren Eisens kommen. Eine Verringerung des Pools führt dabei zu einer Verminderung der Eisenbindung durch sogenannte eisenbindende Proteine (IRPs = *Iron Regulatory Proteins*). Diese binden daraufhin an sogenannte eisenregulierende Elemente (IREs = *Iron Responsive Elements*), d. h. an definierte Ferritin-mRNA-Abschnitte sowie an Abschnitte der Transferrinrezeptor-mRNA. Infolgedessen werden die Translation der Ferritin-mRNA blockiert sowie die Translation der mRNA (*messenger Ribonukleinsäure*) des Transferrinrezeptors durch Verhütung des Abbaus der Transferrinrezeptor-mRNA gesteigert.^[63] Die Zelle kann nun vermehrt transferringebundenes Eisen aufnehmen. Ein Eisenüberangebot und ein erhöhter Pool an chelatisierbarem Eisen führen dagegen durch verminderte Bindung der IRPs an die IREs zu einer gesteigerten Synthese von Ferritin.^[49] Während unter pathologischen Bedingungen eine Eisenfreisetzung aus Ferritin durch „reduzierenden Stress“ (z. B. durch Superoxid-Radikalanionen) oder durch Proteolyse verursacht werden soll,^[4, 5, 8] ist ungeklärt, durch welchen Mechanismus Ferritin-Eisen unter physiologischen Bedingungen mobilisiert wird. Des weiteren ist nicht genau bekannt, ob Eisen außer aus dem cytosolischen Ferritin auch aus lysosomalem Hämosiderin freigesetzt werden kann. Vermutlich ist Eisen aus Hämosiderin jedoch wesentlich schwerer mobilisierbar als aus Ferritin. Durch die strenge Regulation des chelatisierbaren Eisenpools wird neben der Aufrechterhaltung der Biosynthese eisenhaltiger Proteine vor allem einer potentiell gefährlichen Erhöhung dieses Pools entgegengewirkt.

1.4 Chelatisierbares Eisen in Mitochondrien

Die zentrale Rolle der Elektronenübertragung auf Sauerstoff im Rahmen der Zellatmung macht die Mitochondrien in den meisten Zellen zur primären Quelle reaktiver Sauerstoffspezies.

Die Mitochondrien sind besonders hochstrukturierte zelluläre Organellen. Sie besitzen eine ellipsoide bis fadenförmige, gelegentlich auch kugelförmige Struktur, sind 2 - 4 μm lang, bis zu 1 μm dick und kommen in wechselnder Zahl in allen Sauerstoff-verbrauchenden Zellen vor. Zellen mit sehr hohem Substratdurchsatz und Sauerstoffverbrauch wie Herzmuskelzellen und Leberparenchymzellen (Hepatozyten) weisen eine besonders große Zahl von Mitochondrien auf. Alle Mitochondrien besitzen zwei sich deutlich voneinander abhebende Membranstrukturen (Abbildung 5), die Außenmembran, die das Mitochondrium vom Cytosol abgrenzt und die Innenmembran.

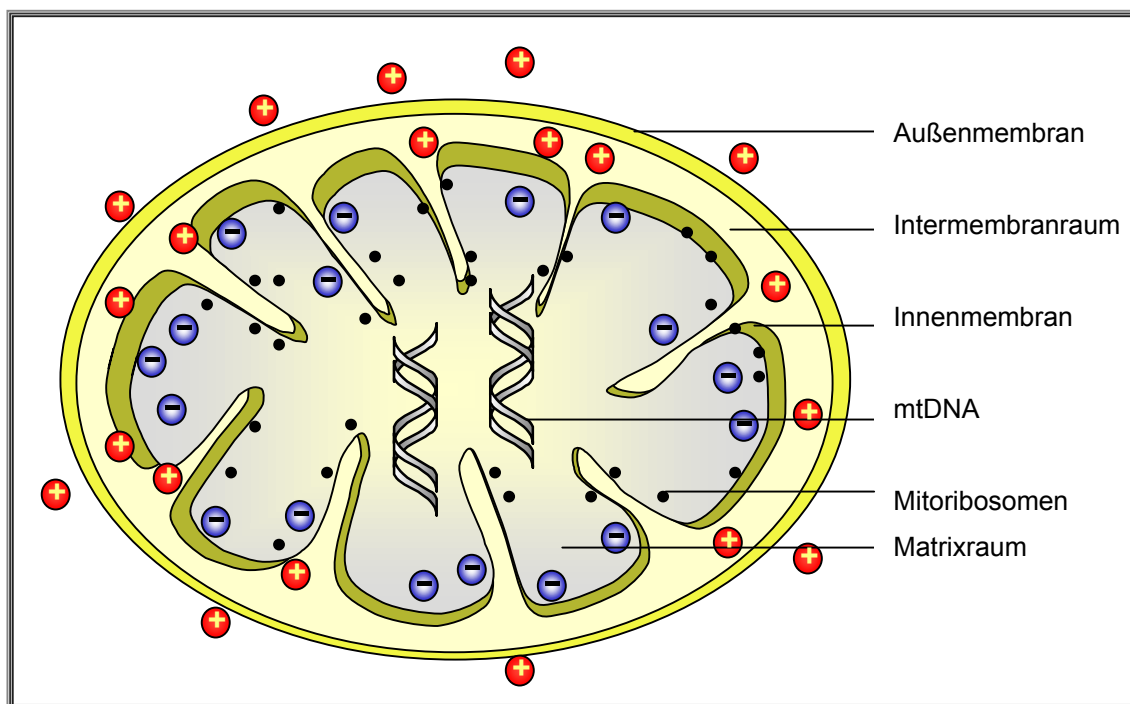
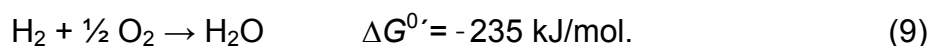


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Mitochondriums.

Die mitochondriale Außenmembran enthält eine Reihe von Poren und ist damit im Gegensatz zur Innenmembran für viele Substanzen gut durchlässig. Die sehr viel strukturiere und extrem proteinreiche Innenmembran zeigt zahlreiche Einstülpungen, die als Cristae bezeichnet werden. Dies trägt zu einer enormen

Vergrößerung der Membranoberfläche bei. Für Mitochondrien aus 1 g Leber sind dies beispielsweise 3.3 m^2 .^[64] Im Matrixraum der Mitochondrien befinden sich mitochondrieneigene, ringförmige DNA-Moleküle (mtDNA) und an der der Matrix zugewandten Seite der inneren Membran sind Ribosomen angeheftet. In der mitochondrialen Matrix sind u. a. die Enzyme der β -Oxidation der Fettsäuren, des Citratzyklus sowie Teile des Harnstoffzyklus zu finden. Dort erfolgen außerdem mtDNA-Replikation, mitochondriale Proteinbiosynthese sowie Teile der Hämsynthese und der Biosynthese von Fe/S-Proteinen. Die mitochondriale Innenmembran ist als Träger der Enzymsysteme der biologischen Oxidation sowie der oxidativen Phosphorylierung (Bildung von ATP) von entscheidender Bedeutung für den Zellstoffwechsel. Zum besseren Verständnis der damit verbundenen Generierung reaktiver Sauerstoffspezies sei zunächst auf den Ablauf der in den Mitochondrien stattfindenden Zellatmung eingegangen.^[12, 64-66]

Der weitaus größte Teil der Energiegewinnung des Organismus erfolgt innerhalb der Mitochondrien durch Kopplung von Wasserstoff- bzw. Elektronentransport an die ATP-Bildung aus ADP und anorganischem Phosphat. Die Sequenz von Enzymen und Überträgern (Carriern), die für den Transport der Reduktionsäquivalente von $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Nicotinamid-adenin-dinucleotid bzw. seine reduzierte Form) zum molekularen Sauerstoff verantwortlich sind, wird als Atmungskette bezeichnet. Formal handelt es sich hierbei um die stark exergone Reaktion von Wasserstoff mit Sauerstoff unter Bildung von Wasser, die Knallgasreaktion:



Die mitochondriale Wasserbildung verläuft jedoch im Gegensatz zu Reaktion (9) über ein Kaskadensystem von Redoxpartnern unterschiedlichen Redoxpotentials, die in den Transport von Wasserstoff bzw. Elektronen zum Sauerstoff eingeschaltet sind.

Die zelluläre Atmung vollzieht sich grundsätzlich in drei Abschnitten. Der erste Abschnitt besteht in der oxidativen Decarboxylierung von Brenztraubensäure aus der Glykolyse (oder dem Abbau bestimmter Aminosäuren) und der β -Oxidation der Fettsäuren, z. B. aus der Hydrolyse von Triglyzeriden, zu aktivierter Essigsäure (Acetyl-Coenzym A). Der zweite Abschnitt umfasst den vollständigen Abbau des Acetyl-Coenzym A zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoffatomen (in Form von $\text{NADH} + \text{H}^+$) durch Decarboxylierungs- und Dehydrierungsreaktionen im Citratzyklus. Der dritte und entscheidende Abschnitt besteht in der oxidativen Phosphorylierung.

Dabei werden zunächst vom $\text{NADH} + \text{H}^+$ Wasserstoff und Elektronen auf FMN (Flavin-mono-nucleotid bzw. Riboflavin-5'-phosphat) übertragen. Die Elektronen des FMNH_2 werden im Anschluss über Fe/S-Cluster von Ubichinon (Coenzym Q) übernommen. Außer FMN kann auch Succinat als Reduktionsmittel dienen, das Elektronen und Wasserstoffatome auf FAD (Flavin-adenin-dinucleotid) überträgt und dabei zu Fumarat oxidiert wird. Vom gebildeten Ubichinol ausgehend erfolgt ein Elektronentransport über verschiedene (eisenenthaltende) Cytochrome. Die im Verlauf des Elektronentransportes von $\text{NADH} + \text{H}^+$ (FADH_2) auf Sauerstoff freigesetzte Energie wird zunächst zur Translokation von Protonen vom Matrix- in den Intermembranraum der Mitochondrien und später zur Regeneration von ATP durch Phosphorylierung von ADP verwendet und damit chemisch gespeichert. Da die innere Mitochondrienmembran für hydrophile Ionen mit lokalisierter Ladung impermeabel ist, kommt es dabei zur Ausbildung eines pH-Gradienten ($\Delta\text{pH} \sim 1$), wobei der Intermembranraum saurer ist als die Matrix. Die Differenz der H^+ -Ionenkonzentrationen bewirkt außerdem die Ausbildung eines Gradienten der elektrischen Ladung, der einem Membranpotential von ungefähr 150 mV entspricht.^[65] Diese elektrochemische Potentialdifferenz wird von der ATP-Synthase ($\text{F}_1\text{F}_0\text{-ATPase}$) zur Phosphorylierung von ADP via Rücktransport von Protonen in die mitochondriale Matrix genutzt.

Die Atmungskette ist somit in vier Multienzymkomplexen (Komplexe I - IV, Tabelle 1, Abbildung 6) angeordnet, die den Wasserstoff- bzw. den Elektronentransport katalysieren und die oben geschilderten Redoxpaare als Coenzyme enthalten. Als Komplex V wird häufig die protonengetriebene ATP-Synthase bezeichnet.

Tabelle 1: Die Enzymkomplexe der Atmungskette

Komplex	Bezeichnung	prosthetische Gruppe
I	NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase	FMN, 3-5 Fe/S-Zentren
II	Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase	FAD, 3 Fe/S-Zentren, Häm b ₅₆₀
III	Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase	Häm b ₅₆₂ , Häm b ₅₆₆ , Häm c ₁ 1 Fe/S-Zentrum
IV	Cytochrom c-Oxidase	Häm a, Häm a ₃ , Cu

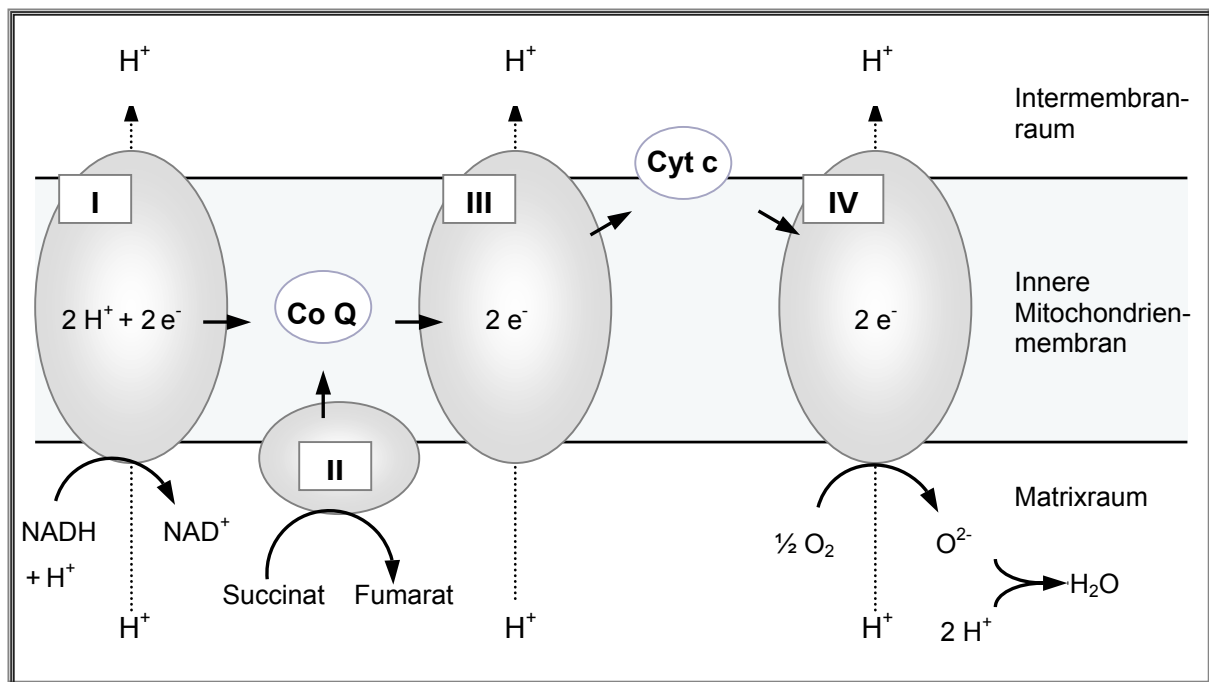


Abbildung 6: Vereinfachtes Schema zur Anordnung der Wasserstoff- und Elektronen-transportierenden Multienzymkomplexe der Atmungskette (Co Q: Coenzym Q, Cyt c: Cytochrom c).

Aufgrund von Fehlübertragungen (etwa 1 - 3 %) während des Elektronentransports innerhalb der mitochondrialen Atmung werden durch die direkte Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff fortwährend Superoxid-Radikalanionen

gebildet. Das intermediär auftretende Semiubichinon scheint dabei der wichtigste Elektronen-Donor zu sein (Abbildung 7).^[67]

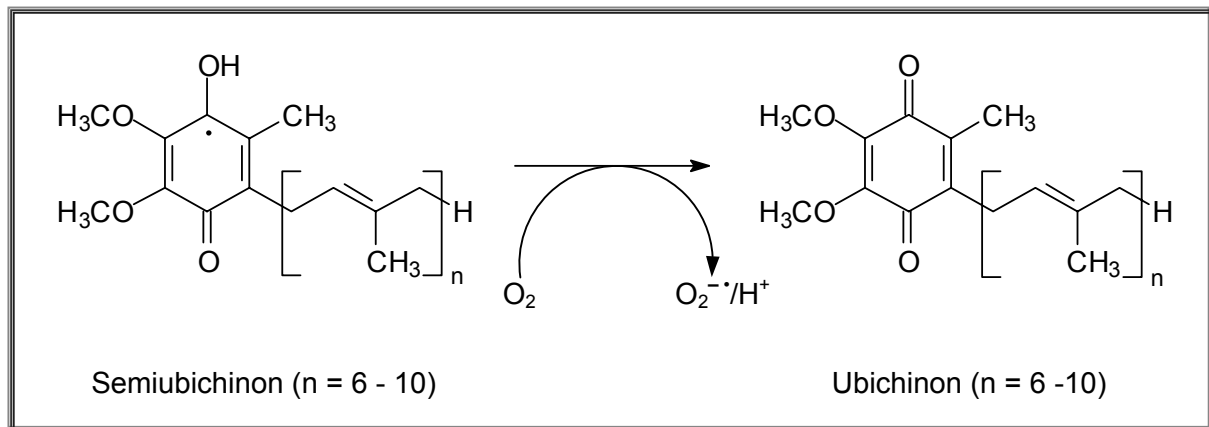


Abbildung 7: Während der mitochondrialen Atmung entstehen aus Ubichinonen Semi-ubichinonradikale, die in einer spontan ablaufenden Reaktion mit O_2 rückgebildet werden können. Bei dieser Rückreaktion wird $O_2^{\cdot -}$ erzeugt.

Wie bereits erwähnt, kann gebildetes $O_2^{\cdot -}$ nun wiederum durch (mitochondrial lokalisierte) MnSOD in H_2O_2 umgewandelt werden, das z. B. mittels Katalase zu Wasser reduziert wird. In Gegenwart von Fe^{2+} erfolgt die Bildung der hochreaktiven $\cdot OH$ -Radikale. Auf die Notwendigkeit eines mitochondrialen Übergangspools an chelatisierbarem Eisen wurde zuvor hingewiesen. Mutationen der mtDNA infolge oxidativen Stresses werden für eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen wie die Parkinsonsche Krankheit, Morbus Huntington oder Morbus Alzheimer verantwortlich gemacht.^[68, 69] Zu ihren Symptomen zählen u. a. Demenz und Störungen der Koordination von Muskelbewegungen (Ataxie); zum Teil wird dabei eine Beteiligung von Eisen diskutiert.^[12] Als ein spezielles Beispiel eisenvermittelter Schädigungen innerhalb der Mitochondrien soll an dieser Stelle näher auf die Friedreich-Ataxie eingegangen werden.

Die Friedreich-Ataxie ist die weltweit häufigste Ataxieform (~ 1 : 50000). Der klinische Befund umfasst u. a. progressive Ataxie, Dysarthrie, Areflexie, Skelettdeformationen sowie hypertrophe Kardiomyopathie. Die Patienten sind meist 10 - 15 Jahre nach Ausbruch der Krankheit an den Rollstuhl gebunden und sterben in der Regel an Herzversagen. Die Krankheit wird durch einen Mangel an mitochondrial lokalisiertem Friedreich-Ataxie-Protein (Fratxin) verursacht.^[69, 70] Frataxin ist ein in der Evolution weit zurückzuverfolgendes Protein mit homologen Genen in der Maus und selbst in

Hefen. Hefen besitzen beispielsweise kein Ferritin und als einziges potentiell Eisen-speicherprotein das sogenannte YFH1 (*yeast frataxin homologue*), das Homologe zum humanen Frataxin.^[60] Hefen, denen das Frataxinhomologon YFH1 fehlt, werden anfällig für oxidativen Stress. So werden u. a. Schädigungen der mtDNA beobachtet, verursacht durch eine Eisenakkumulation in den Mitochondrien der Hefen. Dementsprechend wird vermutet, dass Frataxin eine Bedeutung in der Eisenhomöostase der Mitochondrien besitzt und dort speziell den Eisentransport aus den Mitochondrien in das Cytosol vermittelt. Wahrscheinlich kommt es durch den erhöhten chelatisierbaren Eisenpool in den Mitochondrien zu einer gesteigerten Bildung von Sauerstoffradikalen verbunden mit einer sekundären Schädigung von Atmungskettenenzymen.^[71-73] So wurde bei der humanen Friedreich-Ataxie mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie eine Störung der mitochondrialen Energieproduktion bei allen Friedreich-Ataxie-Patienten nachgewiesen.^[74]

Neben dieser - explizit auf eine Beteiligung des mitochondrialen Eisenpools zurückgeführten - Erkrankung sowie den vorgenannten Krankheitsbildern, für die diesbezüglich schwächere Hinweise gefunden wurden, existieren auch zahlreiche Modelle der Zellschädigung, in denen dem mitochondrialen Eisenpool erstaunlicherweise bisher keinerlei Beachtung geschenkt wurde. Zutreffend ist dies beispielsweise für Modelle der Apoptose, in denen es zum Auftreten eines mitochondrialen Permeabilitätsübergangs kommt. Dabei ist die zentrale Rolle der Mitochondrien genauso unumstritten wie eine mitochondriale Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und eine mitochondriale Lipidperoxidation.^[75-78] Die bislang trotz der genannten Hinweise geringe Beachtung des mitochondrialen chelatisierbaren Eisens mag nicht zuletzt auf fehlende Untersuchungen zurückzuführen sein - vorwiegend bedingt durch für solche Fragestellungen inadäquate Messmethoden.

1.5 Bestimmung des zellulären chelatisierbaren Eisens

Trotz der hohen funktionellen und (patho)physiologischen Bedeutung des chelatisierbaren zellulären Eisens war dieser Pool lange Zeit sehr schlecht charakterisiert. Eine Begründung liefert der relativ geringe Anteil des chelatisierbaren Eisens am zellulären Gesamteisen und dadurch bedingte methodische Probleme. Die im Verlauf der letzten fünf Jahrzehnte vornehmlich entwickelten Methoden lassen

sich hinsichtlich der Aufarbeitung des biologischen Materials grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilen: disruptive und nicht-disruptive Methoden. Disruptive Techniken bedienen sich zunächst der Homogenisierung (mechanisch) oder der Lyse (durch Detergenzien) des biologischen Materials, gefolgt von der eigentlichen Quantifizierungsmethode. Zu diesen Quantifizierungsmethoden zählen zum einen Nachweise verschiedener Eisen-Chelatkomplexe - nach Zusatz der Liganden zur Probe - durch HPLC (High Performance Liquid Chromatography)^[3, 5] oder Spektrophotometrie,^[79] zum anderen werden die ESR-Spektroskopie (Elektronenspinresonanzspektroskopie)^[79], AAS (Atomabsorptionsspektroskopie)^[80], Mößbauer-Spektroskopie^[11] oder der einer Ultrafiltration nachfolgende Bleomycin-Assay^[81, 82] eingesetzt. Alle diese disruptiven Methoden sind sehr anfällig für artifizielle Veränderungen des chelatisierbaren Eisenpools. Dies spiegelt sich in der breiten Streuung der Werte wider, die mit diesen Techniken erhalten wurden, z. B. 3.5 - 231 µM für Lebergewebe/Hepatozyten.^[4, 5, 79, 80] Der größte Nachteil solcher Methoden besteht in der Gefahr, durch die Zerstörung der Zellstrukturen ursprünglich fest gebundenes Eisen zu mobilisieren und dieses fälschlicherweise als chelatisierbares Eisen zu detektieren. Die angesprochene Mobilisierung kann dabei durch den mechanischen Eingriff selbst erfolgen oder durch eisenfreisetzende (proteinabbauende) Enzyme vermittelt werden.^[8] Mit dem Aufschluss der Zellen kann außerdem eine erhebliche Verdünnung der intrazellulären Reduktionsmittel verbunden sein, die eine Unterschätzung der Größe des chelatisierbaren Eisenpools verursacht, da in wässriger Lösung schwer lösliche, in der Regel polynukleare Aggregate von Fe³⁺-Salzen $(\text{Fe}_p\text{O}_r(\text{OH})_s)^{3p-(2r+s)}$ ^[83] gebildet und so dem angeschlossenen Detektionsverfahren entzogen werden.

Zu den nicht-disruptiven Methoden zählen die auch an intaktem Gewebe anwendbare ESR-Spektroskopie, radioaktive Markierungsmethoden und die Fluoreszenzspektroskopie. Erheblicher Nachteil der ESR-Technik ist die Einschränkung auf den Nachweis von Metall-Ionen mit ungepaarten Elektronen - Fe²⁺ in *low-spin*-Komplexen wird damit nicht erfasst. Ein großer Nachteil bei der Nutzung radioaktiver Isotope besteht in der Notwendigkeit, umfangreiche Schutzvorkehrungen vor der hochenergetischen β - oder γ -Strahlung zu treffen. Nicht-disruptiv kann mittels radioaktiver Markierungen durch Inkubation mit ⁵⁵Fe oder ⁵⁹Fe nur die Aufnahme bzw. die Freisetzung von Eisen, nicht jedoch der chelatisierbare Eisenpool gemessen werden.^[8]

Erst seit kurzem stehen - begünstigt durch die Entwicklung der Lichtmesstechnik und der kommerziellen Verfügbarkeit von hochempfindlichen Messgeräten - für die Bestimmung chelatisierbaren Eisens fluoreszenzmikroskopische Methoden (digitale Fluoreszenzmikroskopie oder Laser-Scanning-Mikroskopie) zur Verfügung, die die Nachteile der letztgenannten Messverfahren ausschließen und zudem auch Messungen auf Einzelzellebene ermöglichen. Sie sind weit weniger invasiv und können in vitalen Zellen eingesetzt werden, so dass Artefakte durch Probenaufbereitung ausgeschlossen sind. Die extrem hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzspektroskopie erlaubt eine Nachweisgrenze von submikromolaren Eisenkonzentrationen.^[6, 7, 10, 13]

1.6 Fluoreszenzmikroskopische Methoden zur Bestimmung chelatisierbaren Eisens

Fluoreszenzmikroskopische Bestimmungsmethoden für chelatisierbares Eisen basieren auf Fluoreszenzindikatoren bzw. Metall-sensitiven Molekülen, die eine schnelle Veränderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften als Ergebnis einer Interaktion mit chelatisierbarem Eisen erfahren. Solche Metallsensoren enthalten neben dem signalgebenden Molekülteil (fluoreszenzgebende Komponente oder Fluorophor) noch eine „Reaktivgruppe“ - eine Ligandenfunktion (Metall-Rezeptor), die die Anbindung an das Metallion durch Komplexbindung ermöglicht. Zwischen diesen beiden Gruppen befindet sich meist ein geeigneter Abstandshalter (Spacer oder Linker), der eine sterische Wechselwirkung zwischen signalgebendem Molekülteil und Ligandenfunktion verhindern oder erschweren soll und somit dem Eisenion einen ungehinderten Zugang erlaubt.

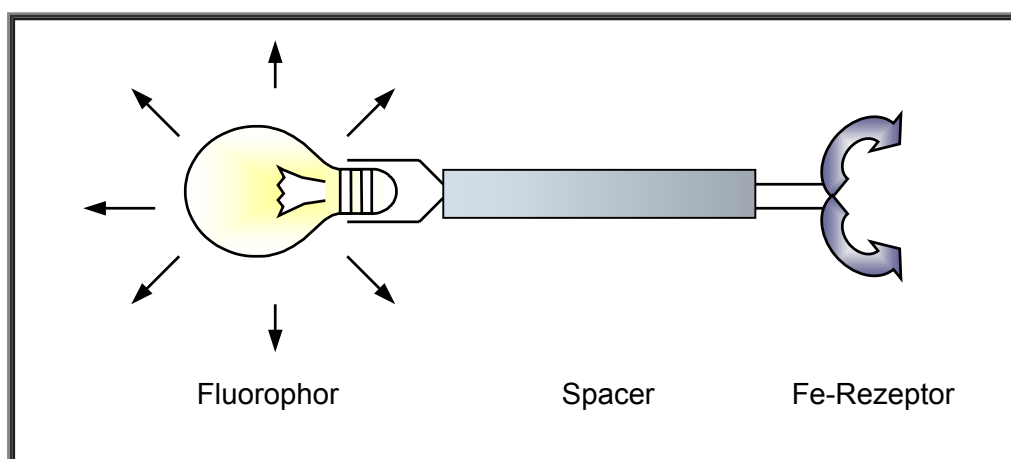


Abbildung 8: Schematischer Aufbau von Fluoreszenzsonden zum Nachweis von Eisenionen.

1.6.1 FLUORESZENZ-PROZESS UND FLUORESZENZLÖSCHUNG

Die zu den Lumineszenzprozessen zählende Fluoreszenz organischer Verbindungen beruht auf intramolekularen Elektronenübergängen. Diese Form der Lichtemission ist das Ergebnis eines Anregungsprozesses, der besonders häufig bei polyaromatischen Kohlenwasserstoffen oder Heterozyklen beobachtet wird. Während der Absorption (ABS) werden die durch eine externe Lichtquelle (z. B. Laser) freigesetzten Photonen geeigneter Energie $h\nu_{\text{exc}}$ vom Fluorophor absorbiert. Das Fluorophor geht dabei von seinem Grundzustand S_0 in einen elektronisch sowie schwingungs-angeregten Singulett-Zustand S_n^* ($n \geq 1$) über. Der angeregte Zustand existiert für einen definierten Zeitraum, in dem das Molekül Wechselwirkungen mit seiner Umgebung eingehen kann und zahlreiche Konformationsänderungen erfährt. Als Konsequenz dieser Interaktion findet durch Abgabe von Schwingungsenergie zunächst ein strahlungsloser Relaxationsprozess in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands S_n statt (Schwingungsrelaxation, SR) und danach folgt (mit Ausnahme weniger Moleküle wie Azulen, dem bekanntesten Beispiel für einen strahlenden S_2 - S_0 -Übergang) sehr rasch ein horizontaler strahlungsloser Übergang in den niedrigsten elektronisch angeregten Zustand S_1 (innere Umwandlung, engl. *internal conversion*, IC). Die zur Rückkehr in den Grundzustand S_0 erforderliche Energieabgabe wird durch Lichtemission - den

vertikalen Strahlungsübergang Fluoreszenz (FL) - erreicht. Prozesse wie die strahlungslose Deaktivierung in den Grundzustand S_0 oder der Übergang in den Triplettzustand T_1 (Interkombination, engl. *intersystem crossing*, ISC) führen als Konkurrenzreaktionen der Fluoreszenz zu einer Verminderung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F . Diese ist eine wichtige Maßzahl zur Quantifizierung des Fluoreszenzvermögens einer Verbindung und ist definiert als Quotient aus der Anzahl der emittierten durch die Anzahl der absorbierten Photonen.^[84]

$$\Phi_F = \frac{\text{Zahl emittierter Lichtquanten}}{\text{Zahl absorbierter Lichtquanten}} \quad (10)$$

Aufgrund des Energieverlustes während der Schwingungsrelaxation ist die emittierte Energie $h\nu_{em}$ geringer als $h\nu_{exc}$ und demzufolge die Emissionswellenlänge stets größer als die der Absorption. Die Energiedifferenz $h\nu_{exc} - h\nu_{em}$ wird „Stokes-Verschiebung“ genannt. Da die Schwingungszustände der verschiedenen elektronisch angeregten Zustände gleiche Strukturen besitzen, sind Absorptions- und Fluoreszenzspektrum spiegelsymmetrisch. In dem vereinfachten Termschema in Abbildung 9 sind die wichtigsten photophysikalischen Vorgänge mit ihren typischen Lebensdauern τ [s] zusammengefasst.^[85]

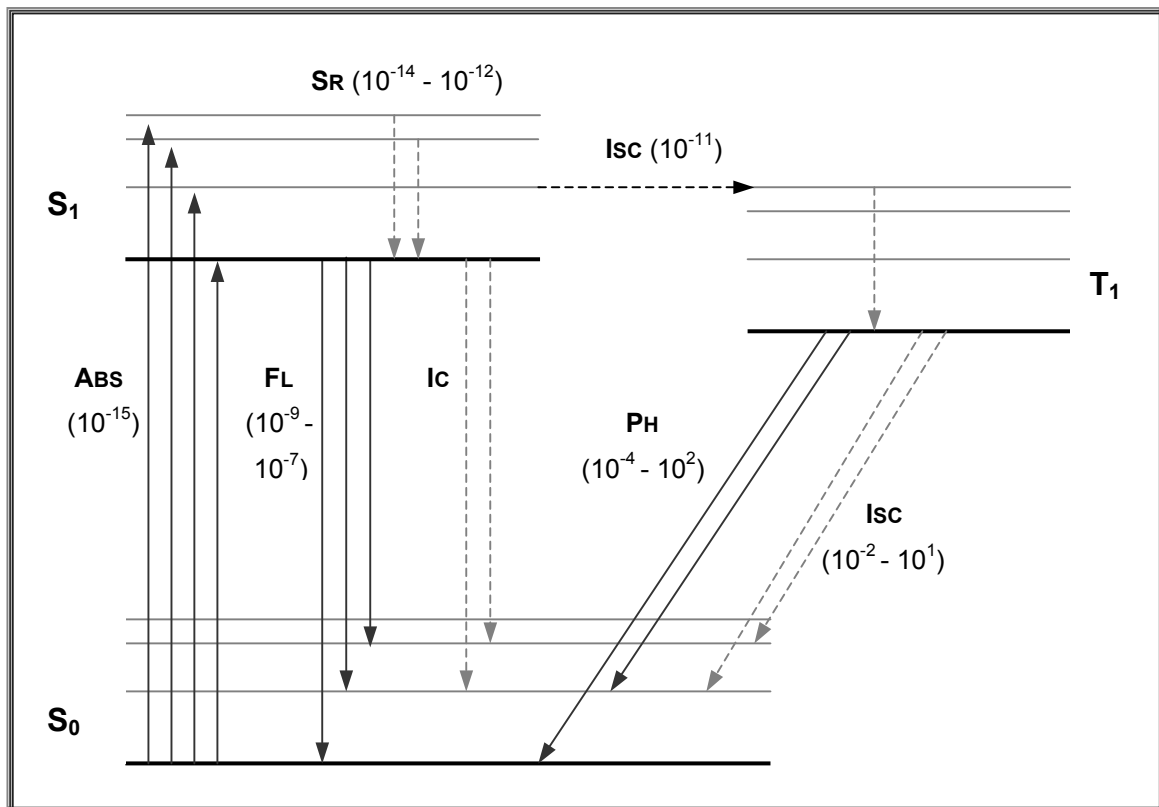
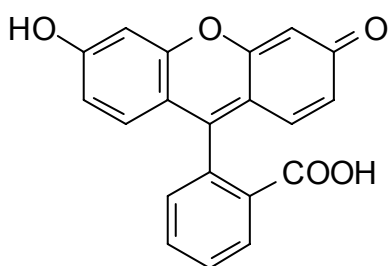
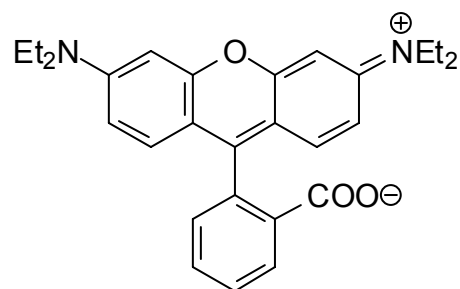


Abbildung 9: Vereinfachtes Termschema (Jablonski-Diagramm) einiger photophysikalischer Prozesse.^[85] (Die Lebensdauern der Prozesse sind in Sekunden angegeben. Die ausgezogenen Pfeile entsprechen strahlenden, die gestrichelten strahlungslosen Prozessen.)

Die stark fluoreszenten Farbstoffe sind auf bestimmte „Molekülklassen“ beschränkt, wobei die Xanthen-Gruppe (Fluoreszein, Rhodamin) und die Acridin-Gruppe (Acridinorange) besonders wichtig sind. Die genannten klassischen Fluorophore zeichnen sich durch ein ausgedehntes planares π -Elektronensystem aus. Ihr Lumineszenzverhalten wird durch einen π , π^* -Anregungszustand bestimmt.



Fluoreszein



Rhodamin B Base

Quantitative Voraussagen über das Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit von der Struktur des fluoreszierenden Moleküls sind derzeit kaum möglich. Ein Vergleich strukturell ähnlicher Moleküle zeigt jedoch, dass Fluoreszenzfarbstoffe ein weitgehend rigides Molekülgerüst besitzen, da andererseits über Schwingungen und Rotationen flexibler Strukturelemente bevorzugt oder ausschließlich eine strahlungslose Deaktivierung des angeregten Fluorophors erfolgt.

Die quantitative Fluoreszenzanalyse kann zur Konzentrationsbestimmung von Substanzen herangezogen werden. Die Intensität F der Fluoreszenz einer Lösung ist proportional der Quantenausbeute Φ_F der gelösten, fluoreszierenden Substanz und der Intensität I_a des von der Substanz absorbierten (Anregungs-)Lichts. I_a kann ausgedrückt werden als Differenz der Intensität I_0 des eingestrahnten und der Intensität I_t des durchgelassenen Lichts. Es ergibt sich:

$$F = \Phi_F (I_0 - I_t). \quad (11)$$

Mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz

$$I_t = I_0 10^{-\varepsilon c d}, \quad (12)$$

wobei ε den molaren Extinktionskoeffizienten ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c die Konzentration (mol L^{-1}) und d die Schichtdicke (cm) der durchstrahlten Lösung bedeuten, erhält man:

$$F = \Phi_F I_0 (1 - 10^{-\varepsilon c d}). \quad (13)$$

Somit lässt sich die Konzentration einer gelösten Substanz direkt aus der Fluoreszenzintensität ihrer Lösung berechnen.

Die Interaktion des Fluorophors bzw. des Fluoreszenzindikators, in dem eine ausreichende räumliche Nähe zwischen Fluorophor und Ligandenfunktion gewährleistet ist, mit Eisenionen (z. B. durch Komplexbildung) führt zu einer statischen Fluoreszenzlöschung (Quenchung). Diese Art der Fremdlöschung ist gekennzeichnet durch eine reversible Bildung fluoreszenzunfähiger bzw. -verminderter Assoziate vor Anregung des Fluorophors. Sie hängt signifikant von Abstand und relativer Orientierung von Fluorophor und Quencher ab. Die durch Anwesenheit von Eisenionen hervorgerufene Fluoreszenzlöschung basiert auf dem sogenannten Schwermetalleffekt. Dabei kommt es aufgrund einer Wechselwirkung des angeregten Fluorophors mit dem Schwermetallion zu einer Verminderung der Fluoreszenzquantenausbeute. Zugrunde liegt eine metallinduzierte Erhöhung der

Spin-Bahn-Kopplung, die eine Aufhebung des Spinverbotes und damit ein vermehrtes ISC, d. h. eine verstärkte Besetzung des Triplettzustandes bewirkt. Die Lage der Maxima von Absorptions- und Emissionsspektren des Fluoreszenzindikators werden durch diese Art der Fluoreszenzlöschung nicht beeinflusst.^[86, 87]

1.6.2 PRINZIP DER FLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN BESTIMMUNGSMETHODE

Alle bisher bekannten fluoreszenzmikroskopischen Methoden zur Untersuchung des chelatisierbaren Eisens in vitalen Zellen basieren auf dem gleichen Prinzip: Die Fluoreszenz in die Zellen eingebrachter Fluoreszenzindikatoren mit Ligandenfunktion wird durch die Komplexbildung mit zellulärem chelatisierbaren Eisen partiell gelöscht. Durch Zugabe eines großen Überschusses eines zweiten membranpermeablen, jedoch nicht-fluoreszierenden Eisenchelators wird das Eisen in Abhängigkeit von den beteiligten Komplexbildungsgleichgewichten vom Indikator entfernt (Entquenchung). Der resultierende Fluoreszenzanstieg ist ein Maß für die intrazelluläre Konzentration chelatisierbaren Eisens, das mittels entsprechender Kalibrierungen quantifiziert werden kann.

Zur Verwendung der Fluoreszenzindikatoren in biologischen Systemen werden die (meist kultivierten) Zellen mit einer lipophilen und damit membranpermeablen Form des Indikators beladen. Für die bislang eingesetzten Indikatoren zur Detektion von Metallionen werden häufig veresterte Fluorescein-Derivate als Fluorophore verwendet. Innerhalb der Zelle spalten zelleigene Enzyme (Esterasen) die Estergruppen und wandeln die zunächst lipophile nicht-fluoreszierende Indikatorform in eine hydrophile fluoreszierende Spezies (Carboxylat-Bildung) um. Diese Eigenschaft bewirkt gleichzeitig die angestrebte intrazelluläre Akkumulation des Fluoreszenzindikators (Abbildung 10). Die intrazelluläre Konzentration und Verteilung eines solchen Indikators hängt damit nicht nur von Beladungskonzentration, -temperatur und -zeit ab sondern auch von der Esteraseaktivität der Zelle sowie von Polarität bzw. Lipophilie von ungespaltener und gespaltener Form des Indikators. Die intrazelluläre Indikatorkonzentration übertrifft aufgrund des Akkumulationsverhaltens gewöhnlich die angewandte Beladungskonzentration um ein Vielfaches.^[8]

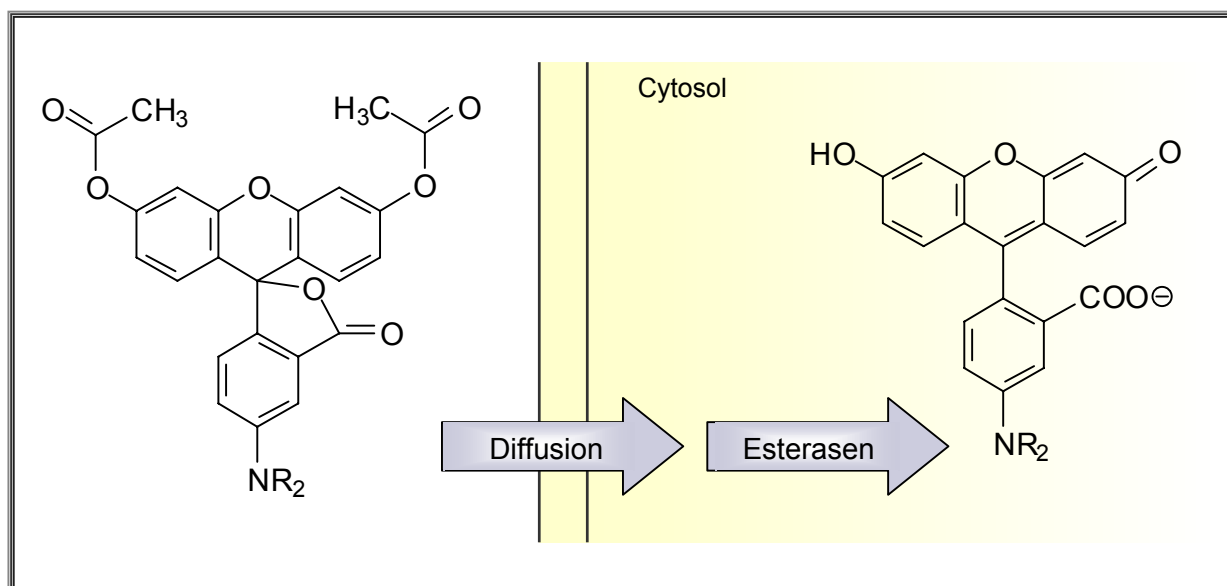
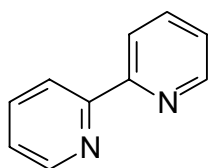


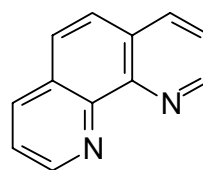
Abbildung 10: Akkumulation der Fluoreszenzindikatoren nach intrazellulärer Umwandlung durch Esterasen.

Für eine nicht nur intrazelluläre sondern spezifisch intramitochondriale Akkumulation von Fluoreszenzindikatoren sollte sich die elektrochemische Potentialdifferenz dieser Zellorganellen zunutze gemacht werden können. Durch die Einführung eines kationischen Zentrums könnten auch für diese Indikatoren bei Verwendung relativ geringer Beladungskonzentrationen hohe intramitochondriale Konzentrationen erreicht werden.

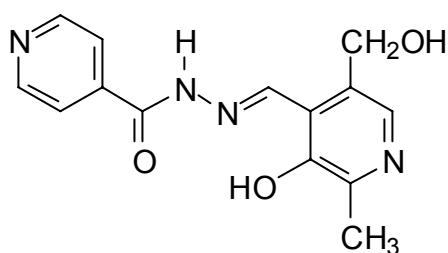
Starke, membrangängige Eisenchelatoren, die im Anschluss an die Beladung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff in großem Überschuss zugegeben werden, sind beispielsweise die bidentaten Liganden 2,2'-Dipyridyl ($\log \beta_3 (\text{Fe}^{2+}) = 17.4$)^[88] und 1,10-Phenanthrolin ($\log \beta_3 (\text{Fe}^{2+}) = 21.3$)^[89] sowie die tridentaten Liganden Salicylaldehydisonicotinoylhydrazon (SIH, $\log \beta_2 (\text{Fe}^{3+}) = .56$)^[90] und Pyridoxalisonicotinoylhydrazon (PIH, $\log \beta_2 (\text{Fe}^{3+}) = 34.0$)^[90]. Nach ihrer Diffusion in die Zelle findet eine Umverteilung der zuvor vom Fluoreszenzindikator komplexierten Eisenionen zu diesen Chelatoren statt,^[8, 11, 91] die Fluoreszenzlöschung wird aufgehoben und die Fluoreszenzquantenausbeute des Indikators steigt wieder an.



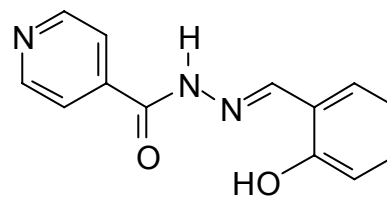
2,2'-Dipyridyl



1,10-Phenanthrolin



PIH



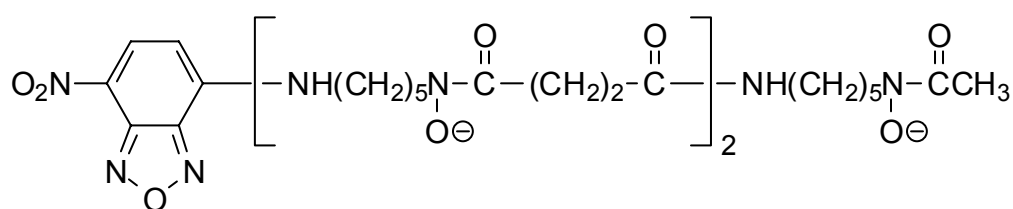
SIH

Die beschriebene Entquenchung ist abhängig von den Komplexbildungskonstanten, von subzellulären Konzentrationen sowie der intrazellulären Verteilung beider chelatisierender Moleküle - Fluoreszenzindikator und nicht-fluoreszierender Chelator. Die Berechnung der Konzentration des chelatisierbaren Eisens aus dem Fluoreszenzanstieg kann prinzipiell sowohl durch *in situ*-Kalibrierung als auch durch *ex situ*-Kalibrierungsmethoden erfolgen. Eine *in situ*-Kalibrierung^[54, 92] bietet den Vorteil, das tatsächliche, intrazelluläre Milieu einer individuellen Zelle unter bestimmten Inkubationsbedingungen berücksichtigen zu können. Sie basiert auf einer vollständigen Äquilibrierung einer definierten extrazellulären Konzentration chelatisierbaren Eisens (im Zellüberstand) mit der intrazellulären Konzentration, die dann ins Verhältnis zu der intrazellulären Indikatorfluoreszenz gesetzt wird. In den meisten Fällen erweist sie sich dennoch als unvorteilhaft, da eine freie Äquilibrierung chelatisierbaren Eisens über die Plasmamembran experimentell sehr schwierig ist. Durch die Vielzahl „natürlicher“ intrazellulärer Liganden kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes und damit zu einer intrazellulären Akkumulation von Eisenionen. Außerdem treten oft unterschiedliche Wirkungen der eingesetzten Ionophore in Abhängigkeit vom Zelltyp auf.^[7] *Ex situ*-Kalibrierungen bergen andere Probleme, beispielsweise können sie grundsätzlich nur bei konstanter Bindungsstöchiometrie des Fe^{n+} /Indikator-Komplexes über den zellulär relevanten Konzentrationsbereich und bei Ausschluss eines Einflusses der Schichtdicke angewandt werden.

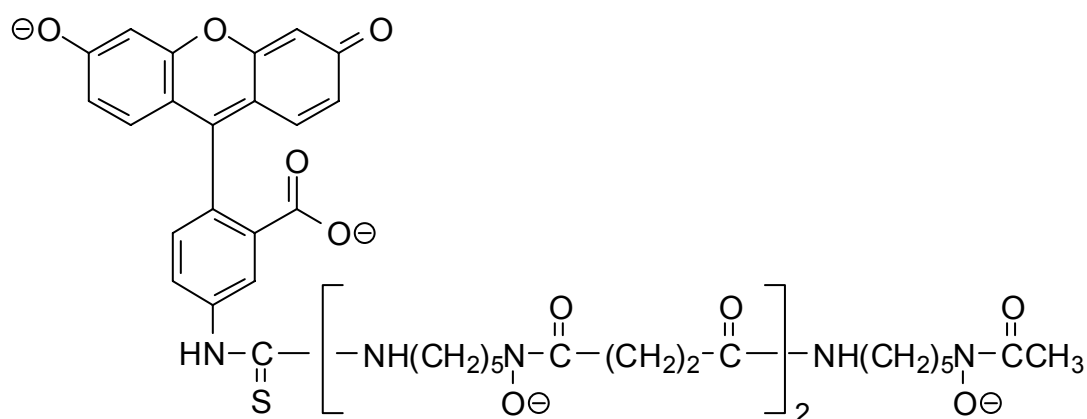
Das erst seit kurzer Zeit^[7] verwendete konfokale Bildaufnahmeverfahren der Laser-Scanning-Mikroskopie erlaubt die Bestimmung der Fluoreszenzintensität eines definierten Volumenelements/optischen Schnittes. Daher kann die (sub)zelluläre Fluoreszenz eines solchen optischen Schnittes direkt mit der eines Indikatorstandards (*ex situ*-Kalibrierung) verglichen werden.

1.6.3 BEKANNTE FLUORESZENZSONDEN ZUR DETEKTION CHELATISIERBAREN EISENS IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN

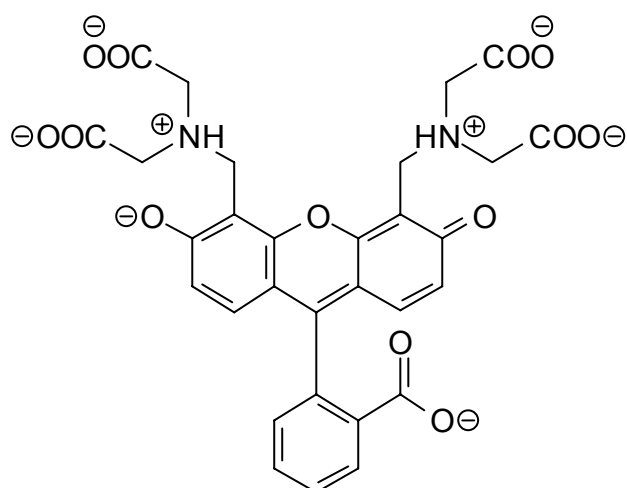
Die Entwicklung von Fluoreszenzindikatoren zur Bestimmung chelatisierbaren Eisens in biologischen Systemen begann vor 13 Jahren mit dem Design von Indikatoren, deren chelatisierende Komponente auf natürlichen oder synthetisch nachempfundenen Siderophoren basiert und die an bekannte Fluorophore gekoppelt wurden. Die bekanntesten dieser Art Fluoreszenzsonden sind 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-desferrioxamin (NBD-DFO)^[93] und *N*-(Fluoreszein-5-thiocarbamoyl)-desferrioxamin (FL-DFO)^[94]. Beide enthalten den sehr effektiven Chelator Desferrioxamin (Desferal®). Dieser sechszählige Ligand ist hochselektiv für Fe³⁺ mit einer Komplexbildungskonstante für den DFO/Fe³⁺-Komplex von $\log \beta = 30.6$ bei einer Bindungsstöchiometrie von 1 : 1.^[45, 95] Desferal zeigt eine deutlich geringere Affinität für andere im zellulären System relevante Metallionen wie Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺. NBD-DFO und FL-DFO weisen bei Messungen in vitalen Zellen jedoch zahlreiche Nachteile auf: Beide Indikatoren sind nicht durch Esterasen spaltbar und diffundieren daher in gleichem Maße durch die Zellmembran aus der Zelle wie in die Zelle - eine intrazelluläre Akkumulation entfällt. NBD-DFO wirkt zudem in einigen Zelltypen cytotoxisch und hat nach Lytton *et al.*^[93] die Eigenschaft, Eisenionen aus Ferritin zu mobilisieren. Zudem stellen beide Indikatoren derart starke Chelatoren dar, dass eine Entquenchung praktisch sehr schwer durchführbar ist.



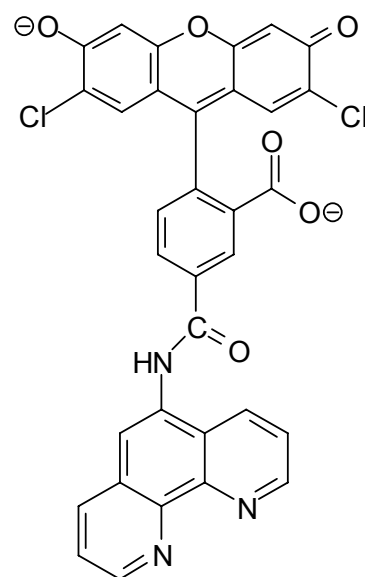
NBD-DFO

**FL-DFO**

Damit sind NBD-DFO und FL-DFO praktisch nicht für zelluläre Messungen einsetzbar. Mitte der Neunziger Jahre wurde eine Methode basierend auf dem Fluoreszenzindikator Calcein^[10, 92] etabliert. Die zur Beladung von Zellen eingesetzte mehrfach veresterte Form, der nicht-fluoreszierende Calcein-Acetoxymethylester, zeichnet sich durch eine hohe Membranpermeabilität aus, dagegen erweist sich das nach Spaltung durch Esterasen erhaltene fluoreszierende, polyanionische Fluoreszein-Derivat (Calcein ist bei physiologischem pH-Wert sechsfach negativ und zweifach positiv geladen)^[96] als nahezu impermeabel für Zellmembranen. Dies führt zu der erwarteten starken intrazellulären Akkumulation des Indikators. Calcein ist im Hepatozyten beinahe ausschließlich in Cytosol und Zellkern lokalisiert (in kultivierten Rattenhepatozyten 89.1 ± 6.0 % der totalen intrazellulären Calceinkonzentration)^[6], da es kaum in der Lage ist, intrazelluläre Membranen zu passieren. Calcein kann somit in vielen Zelltypen ausschließlich cytosolisches und nukleäres chelatisierbares Eisen erfassen. An die fluoreszenzgebende Komponente im Calcein, das Fluoreszein, ist eine EDTA-ähnliche Chelatereinheit gekoppelt. Breuer *et al.*^[54] beschreiben Calcein als Fe^{2+} -Indikator mit einer Bindungsstöchiometrie von 1 : 1 und Komplexbildungskonstanten von $\log \beta \sim 14$ für Fe^{2+} sowie von $\log \beta \sim 24$ für Fe^{3+} . Petrat *et al.*^[7] fanden in reduzierendem Milieu eine starke Abhängigkeit der Bindungsstöchiometrie von der Gegenwart zelleigener organischer Chelatoren, die mit der Chelatkomponente des Calceins um das Eisen konkurrieren können. Als Folge der 1 : 1-Stöchiometrie und der Konkurrenz mit zellulären Liganden ist die Messmethode mit Calcein äußerst insensitiv und weist erhebliche Kalibrierungsprobleme auf. Petrat *et al.* entwickelten aus diesem Grunde eine neue Methode unter Verwendung fluoreszenzmarkierten 1,10-Phenanthrolins - Phen GreenTM SK.^[6]



Calcein



Phen Green™ SK

Phen Green™ SK wird in Form des Diacetats für zelluläre Messungen eingesetzt und akkumuliert ebenso wie Calcein intrazellulär. Die beiden Indikatoren unterscheiden sich jedoch erheblich in ihren Eigenschaften als Fluoreszenzsonden für Eisenionen. So ist Phen Green™ SK im Gegensatz zu Calcein über nahezu alle Kompartimente der Zelle - wenn auch ungleichmäßig - verteilt. Phen Green™ SK komplexiert Fe^{2+} stets im stöchiometrischen Verhältnis von 3 : 1 und bildet dabei im Gegensatz zum Calcein einen redox-inaktiven (d. h. keine Oxygenierung organischer Substrate induzierenden) Komplex. Organische zelluläre Chelatoren konkurrieren nicht mit der starken Chelatfunktion von Phen Green™ SK, wobei die eisenbindende Komponente des Indikators eine sehr viel höhere Affinität zu Fe^{2+} ($\log \beta_3 = 21.3^{[89]}$ für den 1 : 3-Komplex von Fe^{2+} /1,10-Phenanthrolin) im Vergleich zu Fe^{3+} ($\log \beta_3 = 14.1^{[97]}$ für den 1 : 3-Komplex von Fe^{3+} /1,10-Phenanthrolin) aufweist.

Petrat *et al.* setzten die Phen Green™ SK-Methode zunächst unter Verwendung eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops (digitale Fluoreszenzmikroskopie) erfolgreich zur Bestimmung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools von Hepatozyten, Leberendothelzellen und K562-Erythroleukämiezellen ein. Sowohl eine Erhöhung der Konzentration des chelatisierbaren Eisens, hervorgerufen durch Beladen der Zellen mit dem membranpermeablen Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin-Komplex, als auch die Wirkung von Eisenkomplexbildnern wie Desferal®, konnten kontinuierlich an einzelnen Zellen detektiert werden. Vor wenigen Jahren wurde durch die Einführung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie eine deutlich verbesserte

räumliche Auflösung erreicht.^[7] Darüber hinaus besitzt dieses Bildaufnahmeverfahren - wie bereits erwähnt - den entscheidenden Vorteil, dass die konfokale Bildaufnahme eine Bestimmung der Fluoreszenzintensität in definierten Volumenelementen erlaubt. Durch die Verwendung des Laser-Scanning-Mikroskops war es erstmals möglich, die Konzentration chelatisierbaren Eisens auch bei einer, z. B. aufgrund unterschiedlicher Beladung der Zellen mit der Sonde, heterogenen Zellpopulation zu bestimmen.

Auffallend ist, dass bei Verwendung von Phen GreenTM SK als Sonde in der Regel intrazelluläre Konzentrationen an chelatisierbarem Eisen gefunden werden, die um einen Faktor von 3 - 10 über den mit Calcein gemessenen Konzentrationen liegen. So wird für die Calcein-detektierte cytosolische Konzentration chelatisierbaren Eisens in kultivierten Rattenhepatozyten ein Bereich von 0.6 - 1.2 μM angegeben, für die mittels Phen GreenTM SK bestimmte Eisenkonzentration wurde im gleichen Zelltyp ein Wert von $5.0 \pm 2.0 \mu\text{M}$ gefunden.^[8, 13] Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich die wesentlich geringere Affinität des Calceins für die intrazellulär zur Verfügung stehenden Eisenionen sowie die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der beiden Indikatoren. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das chelatisierbare Eisen letztlich über die Komplexbildungseigenschaften des Chelators definiert ist, der zu seiner Detektion eingesetzt wird.

In mit Phen GreenTM SK beladenen Hepatozyten und Leberendothelzellen wurden auch erste Hinweise auf die subzelluläre Kompartimentierung des chelatisierbaren Eisens erhalten.^[13] Chelatisierbares Eisen wurde nicht nur im Cytosol, sondern auch im Zellkern und in den Mitochondrien nachgewiesen. Die Durchführung dieser Versuche machte jedoch deutlich, dass mit einer organellenspezifischen Eisen-Fluoreszenzsonde wie Phen GreenTM SK die Bestimmung des chelatisierbaren Eisenpools in den verschiedenen Zellkompartimenten - insbesondere in den als wichtige Quelle reaktiver Sauerstoffspezies geltenden Mitochondrien - nur äußerst eingeschränkt möglich ist. So konnte niemals eine für die Messungen ausreichend hohe Indikatorkonzentration in den Mitochondrien erzielt werden. Die Konzentration an chelatisierbarem Eisen in Mitochondrien vitaler Rattenhepatozyten konnte lediglich auf $\geq 4.8 \mu\text{M}$ abgeschätzt werden.^[13] Eine Bestimmung in Zellen mit sehr kleinen Mitochondrien wie PC12-Zellen war vollkommen unmöglich.

2 PROBLEMSTELLUNG

Trotz der aufgezeigten großen physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung ist der intramitochondriale Pool chelatisierbaren Eisens immer noch sehr schlecht charakterisiert. Die zu seiner Bestimmung derzeit etablierten Methoden sind ausnahmslos sehr anfällig für Fehlinterpretationen und nicht in vitalen Zellen anwendbar.^[98-100] Eine erst kürzlich eingeführte, auf quantitativer Laser-Scanning-Mikroskopie basierende Fluoreszenzmethode zur Eisenbestimmung lieferte lediglich erste Hinweise auf die Existenz eines chelatisierbaren Eisenpools in Mitochondrien vitaler Zellen.^[13] Der in diesen Messungen verwandte Fluoreszenzindikator Phen GreenTM SK erwies sich vorwiegend aufgrund seiner unzureichenden Akkumulation innerhalb der mitochondrialen Matrix und seiner unvorteilhaften Verteilung auch in anderen Zellkompartimenten als nachteilig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten vor diesem Hintergrund Fluoreszenzsonden zum selektiven Nachweis des chelatisierbaren Eisenpools in Mitochondrien intakter Zellen entwickelt werden. Primäres Ziel war zunächst die Synthese von Fluoreszenzindikatoren sowohl mit einer geeigneten Zielsteuerungskomponente speziell und ausschließlich in die Mitochondrien als auch mit Ligandenfunktion für Eisenionen^H mit definierter Affinität zu Eisen. Dafür waren die einzelnen Molekülkomponenten Fluorophor, Metall-Rezeptor und der verbindende Spacer gezielt auszuwählen und zu verknüpfen. Nach erfolgreicher Synthese sollten die Eigenschaften der neuen Fluoreszenzindikatoren im Hinblick auf ihre Einsetzbarkeit in biologischen Systemen zunächst im zellfreien System untersucht werden. Zu den wichtigsten Informationen zählte in diesem Zusammenhang, ob über den intramitochondrial erreichten Konzentrationsbereich eine konstante Bindungsstöchiometrie des Indikator/Eisen-Komplexes sichergestellt werden kann.

^H Es wird von einem chelatisierbaren Eisenpool ausgegangen, in dem Eisen aufgrund des reduktiven Milieus überwiegend in Form von Fe^{2+} -Ionen vorliegt. Entsprechend sollten hier Eisenindikatoren mit einer spezifischen Bindungskomponente für zweiwertige Eisenionen synthetisiert werden, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass unter aeroben zellulären Bedingungen auch gewisse Mengen Fe^{3+} existieren. In zellulären Anwendungen sollten daher die Eisenindikatoren im Vergleich zu den chelatisierbaren Eisenionen intramitochondrial im Überschuss vorliegen. Da die Quantifizierung des intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens aufgrund der mit der Chelatisierung verbundenen Gleichgewichtsverschiebung unabhängig davon ist, ob das Eisen endogen als Fe^{2+} oder als Fe^{3+} vorkommt, wird von Indikatoren mit entsprechend hoher Komplexbildungskonstante für Fe^{2+} das gesamte chelatisierbare Eisen (Fe^{2+} und Fe^{3+}) komplexiert.

Bei nachgewiesener potentieller Eignung der Indikatoren im zellfreien System sollte der Einsatz der neu entwickelten Indikatoren im zellulären System - aufgrund der Vorbefunde mit Phen GreenTM SK zunächst in kultivierten Rattenhepatozyten - etabliert werden. Dazu mussten Bedingungen gefunden werden, die eine zweckentsprechende Beladung der Zellen mit den Indikatoren und deren spezifisch mitochondriale Lokalisation garantieren. Nach Auswahl einer vorteilhaften Kalibrierungsmethode sollte der mitochondriale chelatisierbare Eisenpool mit dem auf Laser-Scanning-Mikroskopie basierenden Verfahren möglichst quantifiziert werden und dies bevorzugt auf Einzelzellebene. Weiterführend waren die Entwicklung und Anwendung von Fluoreszenzindikatoren mit Ligandeneinheiten mit abgestufter Affinität für Eisenionen angedacht, um die Stärke der Wechselwirkungen der intramitochondrialen Eisenionen mit zelleigenen niedermolekularen Liganden abzuschätzen. Außerdem wurde ein erster Einsatz der Indikatoren in pathobiochemischen Fragestellungen angestrebt. Ansatzpunkt sollte hier das Modell der kälteinduzierten Zellschädigung bilden.

3 ENTWICKLUNG VON FLUORESZENZSONDEN ZUM NACHWEIS CHELATISIERBAREN EISENS IN MITOCHONDRIEN

Die Synthese der vorgenannten Fluoreszenzsonden sollte unter Beachtung des allgemeinen Bauprinzips für Fluoreszenzfarbstoffe mit Metallsensoreinheit erfolgen, d. h. Kupplung von Fluorophor, Spacer und eisenbindender Komponente.

Für den Einsatz im zellulären System musste zudem eine ausreichende Lipophilie der möglichen Indikatoren gewährleistet sein, die ihre Membranpermeabilität garantiert. Zur Zielsteuerung in die Mitochondrien mussten die Fluoreszenzsonden über mindestens ein kationisches Zentrum verfügen, das eine Membranpotential-abhängige Akkumulation der Indikatoren innerhalb der mitochondrialen Matrix ermöglicht.

3.1 Die eisenchelatisierende Komponente

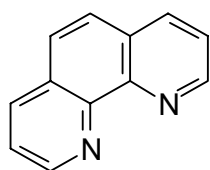
In Anlehnung an den im nukleären und cytosolischen System bewährten Eisen-Indikator Phen GreenTM SK sollte als eisenchelatisierender Baustein zunächst 1,10-Phenanthrolin dienen. Mit einer Bruttokomplexbildungskonstanten $\log \beta_3$ von 21.3^[89] sollte seine eisenbindende Kapazität eine vollständige Erfassung des chelatisierbaren Eisenpools gewährleisten ohne jedoch nennenswerte Mengen Eisen aus Speicherproteinen zu mobilisieren. Diese Verhinderung der Freisetzung von Eisen wird vornehmlich mit kinetischer Hemmung begründet. 1,10-Phenanthrolin sollte damit garantieren, dass nur Eisen des chelatisierbaren Pools komplexiert werden kann, das mit relativ schwacher Komplexbildungskonstante vornehmlich an niedermolekulare Bioliganden (Tabelle 2) gebunden vorliegt.

In Bezug auf die Fragestellung, die tatsächlich vorliegenden Bindungsverhältnisse der intramitochondrialen chelatisierbaren Eisenionen abzuschätzen, sollten unter Berücksichtigung bisher bekannter^[101-107] und exemplarisch in Tabelle 2 aufgeführter Komplexbildungseigenschaften Ligandeneinheiten mit abgestufter Affinität zu Eisen gefunden werden.

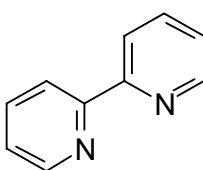
Tabelle 2: Beispiele biologisch relevanter Liganden, an die das Eisen des sogenannten chelatisierbaren Pools gebunden vorliegen kann

Ligand	Komplex <i>K</i>	log <i>K</i>	T (°C)	Lit.
Citrat	Fe ³⁺ [FeL]/[Fe][L]	11.85	25	104
Histidin	Fe ²⁺ [FeL ₂]/[Fe][L] ²	10.43	25	106
Glycin	Fe ²⁺ [FeL ₂]/[Fe][L] ²	7.8	20	107
Tryptophan	Fe ²⁺ [FeL ₂]/[Fe][L] ²	7.6	20	107
Phenylalanin	Fe ²⁺ [FeL ₂]/[Fe][L] ²	6.3	20	107
Lysin	Fe ²⁺ [FeL]/[Fe][L]	4.5	20	105

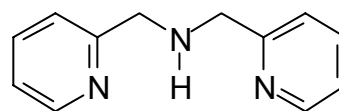
Nach der HSAB-Theorie¹ (hard and soft acids and bases) sind als Chelatoren für zweiwertiges Eisen stickstoffhaltige Heterozyklen besonders geeignet. Dreiwertiges Eisen wird dagegen besser durch sauerstoffhaltige Liganden komplexiert.^[108] Als Ligandeneinheiten kamen somit neben 1,10-Phenanthrolin die Verbindungen 2,2'-Dipyridyl sowie *N,N*-Bis(pyridin-2-ylmethyl)amin in Frage. Die genannten Verbindungen sollten derart derivatisiert werden können, dass durch entsprechende Reaktionen eine unkomplizierte Anbindung an das Fluorophor bzw. eine geeignete Spacereinheit möglich ist.

**1,10-Phenanthrolin**

$$\log \beta_3 = 21.3^{[89]}$$

**2,2'-Dipyridyl**

$$\log \beta_3 = 17.4^{[88]}$$

***N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin**

$$\log \beta_2 = 12.2^{[109]}$$

¹ Das Konzept der harten und weichen (Lewis-)Säuren und (Lewis-)Basen nach Pearson beinhaltet, dass harte Säuren mit harten Basen besonders starke Bindungen ausbilden und entsprechend weiche Säuren mit weichen Basen. Die Begriffe hart und weich umschreiben dabei, wie einfach bzw. schwierig es ist, die entsprechenden Elektronen zu verschieben, also die Polarisierbarkeit der jeweiligen Spezies. Mit Hilfe dieses Konzeptes lassen sich qualitative Voraussagen über die Stärke einer Donor-Akzeptor-Komplexierung treffen. Je besser Donor und Akzeptor zueinander passen, desto stabiler ist der Komplex.

Die angegebenen Komplexbildungskonstanten beziehen sich jeweils auf die freien Komponenten und sind damit näherungsweise auch für die entsprechenden Indikatoren anzunehmen. Unter Beachtung bisher bekannter Komplexbildungseigenschaften zelleigener niedermolekularer Liganden wäre zumindest für den Einsatz des *N,N*-Bis(pyridin-2-ylmethyl)amin-enthaltenden Indikators eine Konkurrenz mit den Bioliganden um das mitochondriale chelatisierbare Eisen zu erwarten. Diese würde sich mehr oder minder deutlich in der gefundenen, durch den Indikator chelatisierbaren Eisenkonzentration niederschlagen. Da jedoch auch Hinweise für biologisch relevante Liganden mit - im Vergleich zu Werten aus Tabelle 2 - größerer Affinität zu Eisenionen existieren, wäre auch bereits bei einem Vergleich der mit Hilfe von Indikatoren mit 2,2'-Dipyridyl- und 1,10-Phenanthrolin-Einheit gefundenen Eisenkonzentrationen eine Differenz denkbar.

3.2 Die fluoreszenzgebende Komponente

Als fluoreszenzgebende Komponenten kamen grundsätzlich alle fluoreszierenden Verbindungen in Frage, die eine ausreichende Quantenausbeute in wässriger Lösung verbunden mit einer guten Membrangängigkeit aufweisen, unter den Anwendungsbedingungen genügend stabil und synthetisch so funktionalisierbar sind, dass eine Ligandenfunktion bzw. der Spacer gebunden werden können. Neben den genannten Anforderungen sollten Fluoreszenzindikatoren für die Anwendung in biologischen Systemen noch zusätzliche Bedingungen erfüllen. Grundsätzlich sind Fluoreszenzmessungen zwar mit höchster Empfindlichkeit möglich, in biologischen Systemen ist die Sensitivität aber durch Hintergrundfluoreszenz und Lichtstreuung drastisch eingeschränkt. Das Hintergrundsignal resultiert hauptsächlich aus der Eigenfluoreszenz zellulärer Moleküle, die einen breiten Wellenlängenbereich überdeckt. Proteine werden beispielsweise bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und emittieren im Bereich von 320 - 350 nm. Andere Bestandteile wie NAD(P)H und Flavine besitzen Absorptionsmaxima um 340 nm bzw. 450 nm und Emissionsmaxima um 450 nm bzw. 515 nm.^[85] Die Lichtstreuung ist besonders bei Lösungen, die Proteine oder kolloidal gelöste Substanzen enthalten, ein Problem. Neben der Rayleigh- und Tyndall-Streuung, die die gleiche Wellenlänge wie das Anregungslicht aufweisen, tritt auch Raman-Streuung mit einer bis zu 50 nm

bathochrom verschobenen Wellenlänge auf. Um die Beeinträchtigungen durch mitochondriale Eigenfluoreszenz und Lichtstreuung während der Messungen zu minimieren, sind die Anregbarkeit im langwelligen Bereich und damit eine langwellige Emission sowie eine große Stokessche Verschiebung als Eigenschaften von Fluoreszenzindikatoren ebenso wünschenswert. Die energieminierte Anregung im langwelligen Bereich reduziert außerdem das Risiko einer photochemischen Zellschädigung sowie einer lichtinduzierten Zersetzung des verwendeten Farbstoffes (*Photobleaching*).

Aus der Vielzahl möglicher Fluorophore erschien die Verbindungsklasse der Rhodamine (Abbildung 11, Tabelle 3) den Anforderungen am ehesten zu entsprechen.

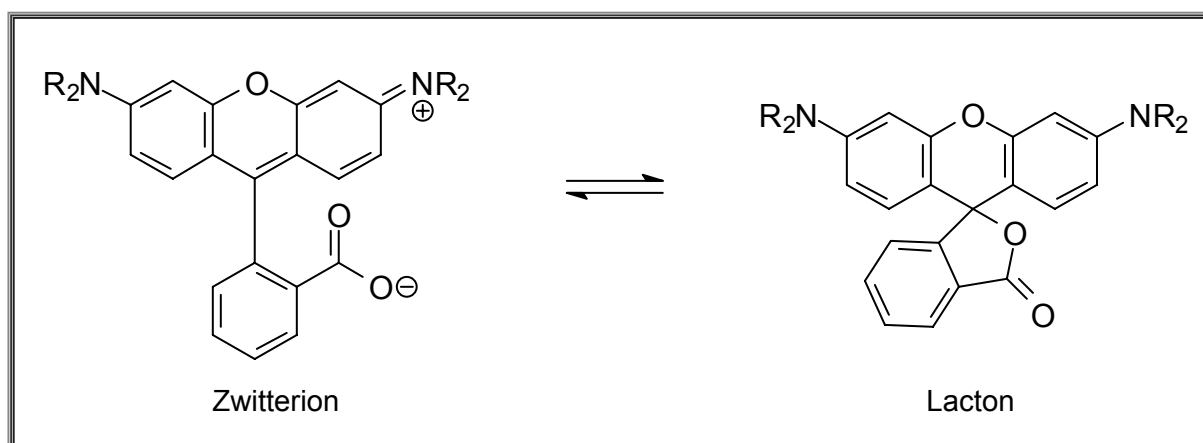


Abbildung 11: Chinoide und lactoide Form der Rhodamine (R siehe Tabelle 3).

Die Rhodamine zeichnen sich durch hohe Quantenausbeuten, gute Photostabilität und geringe Cytotoxizität aus. Des weiteren bewirkt das Xanthen-Grundgerüst eine ausreichende Lipophilie und damit eine gute Membrangängigkeit. Unterschiedliche Derivate dieser Fluorophore werden bereits in biologischen Systemen eingesetzt, u. a. zum Protein-Labeling (z. B. Tetramethylrhodamin) und zur Untersuchung der Zellmorphologie (z. B. Sulforhodamin B). Auch in Mitochondrien-selektiven Anwendungen haben sich Rhodamine bereits bewährt, so z. B. zur Kontrolle eines intakten Membranpotentials dieser Zellorganellen (Tetramethylrhodaminmethylester).

Das Gleichgewicht zwischen farbigem Zwitterion (Z) und farblosem Lacton (L) ist in protischen Lösungsmitteln weit auf die Seite des Zwitterions verschoben. In Wasser findet man beispielsweise eine Präferenz von $Z = 81\%$ bzw. $[Z]/[L] = 4.4$ für

Rhodamin B.^[110] Für die Stabilisierung der zwitterionischen Form sind vor allem starke Lösungsmittel-Farbstoff-Wasserstoffbrücken aber auch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen verantwortlich.

In Abhängigkeit von den Substituenten der Aminogruppen findet man für die Rhodamine eine Verschiebung von Absorptions- und Emissionsspektrum (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verschiebung von Absorptions- und Emissionsspektrum bei Variation der Substituenten R in Abbildung 11

R	Name	Absorptions- maximum	Emissions- maximum	Lösungsmittel	Lit.
H	Rhodamin 110	498 nm	521 nm	H ₂ O	111
CH ₃	Tetramethylrhodamin	543 nm	571 nm	MeOH	112
C ₂ H ₅	Tetraethylrhodamin bzw. Rhodamin B	555 nm ^{a)}	584 nm ^{a)}	EtOH	-

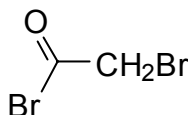
^{a)} Gemessen in einer Konzentration von 5.00 µM in Ethanol

Aufgrund der vorteilhaften Kombination von langwelliger Anregung und Emission sowie der kommerziellen Verfügbarkeit wurde Rhodamin B als Fluorophor ausgewählt. Ein an der Carboxylatgruppe verestertes Rhodamin B-Derivat sollte aufgrund der resultierenden, über das gesamte Xanthen-Gerüst delokalisierten positiven Ladung und dem damit weiterhin erfüllten Kriterium der guten Membranpermeabilität neben der signalgebenden Funktion zusätzlich die Zielsteuerung in die Mitochondrien sicherstellen.

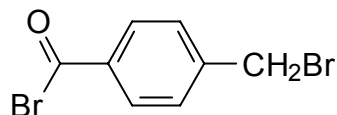
3.3 Der Spacer

Meistens werden einfache, kurze Alkylketten oder Reste, die aromatische und aliphatische Gruppen enthalten, als Spacer verwendet. Da das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung und damit die Empfindlichkeit der Messung vom Abstand zwischen Fluorophor und Quencher abhängen,^[87] muss eine ausreichende räumliche Nähe zwischen beiden Komponenten gewährleistet werden. Die Spacer-Moleküle

müssen außerdem zwei funktionelle Gruppen enthalten, um eine Anbindung sowohl des Fluorophors als auch der eisenbindenden Komponente zu ermöglichen. Basierend auf dem jeweils einfachsten Vertreter der Alkyl- und der Arylgruppe wurden das kommerziell erhältliche Bromacetylbromid und das synthetisch leicht zugängliche 4-Brommethyl-benzoesäurebromid als mögliche Abstandshalter ausgewählt.



Bromoacetyl bromide

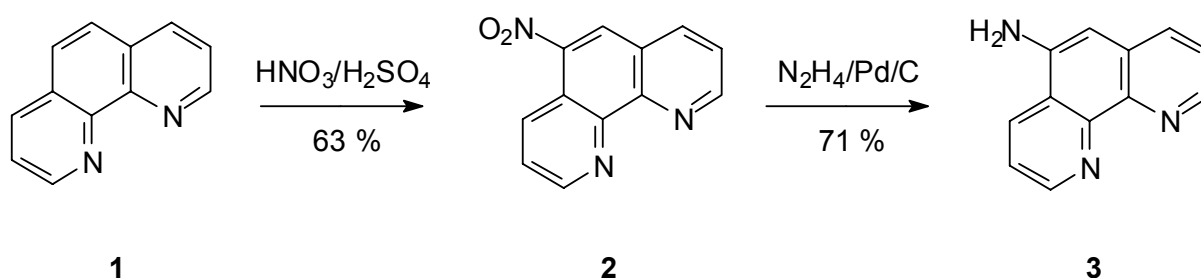


4-bromomethylbenzoyl bromide

Beide Moleküle sollen zur Synthese eines 1,10-Phenanthrolin-enthaltenden Fluoreszenzindikators verwendet werden. Ihr Einfluss auf das resultierende Indikatormolekül soll in späteren Untersuchungen betrachtet werden.

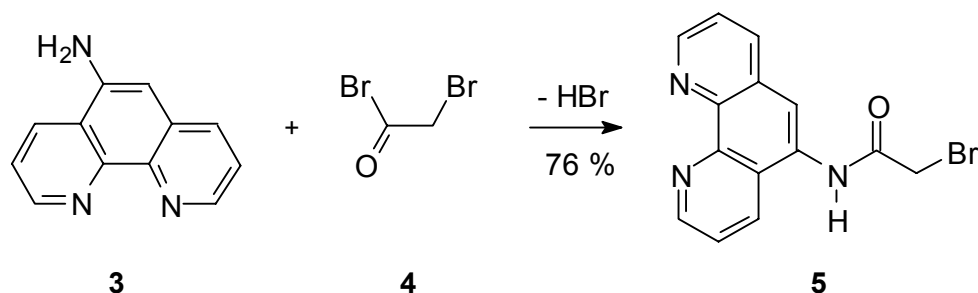
4 SYNTHESEN VON FLUORESZENZSONDEN ZUM NACHWEIS MITOCHONDRIALEN CHELATISIERBAREN EISENS

Prinzipiell soll zur linearen Synthese der Fluoreszenzindikatoren im ersten Schritt die Modifikation des Chelators in der Art vorgenommen werden, dass eine Reaktion mit der Säurehalogenidgruppierung der bifunktionalen Spacermoleküle gelingt. Als Chelatereinheit wurde aus bereits genannten Gründen zunächst 1,10-Phenanthrolin (**1**) gewählt. 1,10-Phenanthrolin (**1**) wurde in Form seines Monohydrats zur Nitrierungsreaktion eingesetzt. Der elektrophile Angriff des aromatischen Systems unter Bildung von 5-Nitro-1,10-phenanthrolin^[113] (**2**) erfolgt trotz aggressiver Bedingungen ausschließlich an den reaktiven Positionen 5 bzw. 6 des Phenanthrolinringes. Die nachfolgende Reduktion des Mononitro-Derivates **2** zu 1,10-Phenanthrolin-5-amin (**3**) gelang nach der Methode von Lecomte *et al.*^[114] unter Verwendung von Hydrazin Monohydrat als Reduktionsmittel und Palladium auf Aktivkohle als Katalysator. Die Entscheidung, Hydrazin trotz cancerogener Einstufung als Wasserstofflieferanten zu verwenden, gründete zum einen auf der Vermeidung nachhaltigerer Nebenprodukte als Wasser und Stickstoff und zum anderen auf der vorteilhaften Ankündigung des Reaktionsendes durch nachlassende Gasentwicklung.

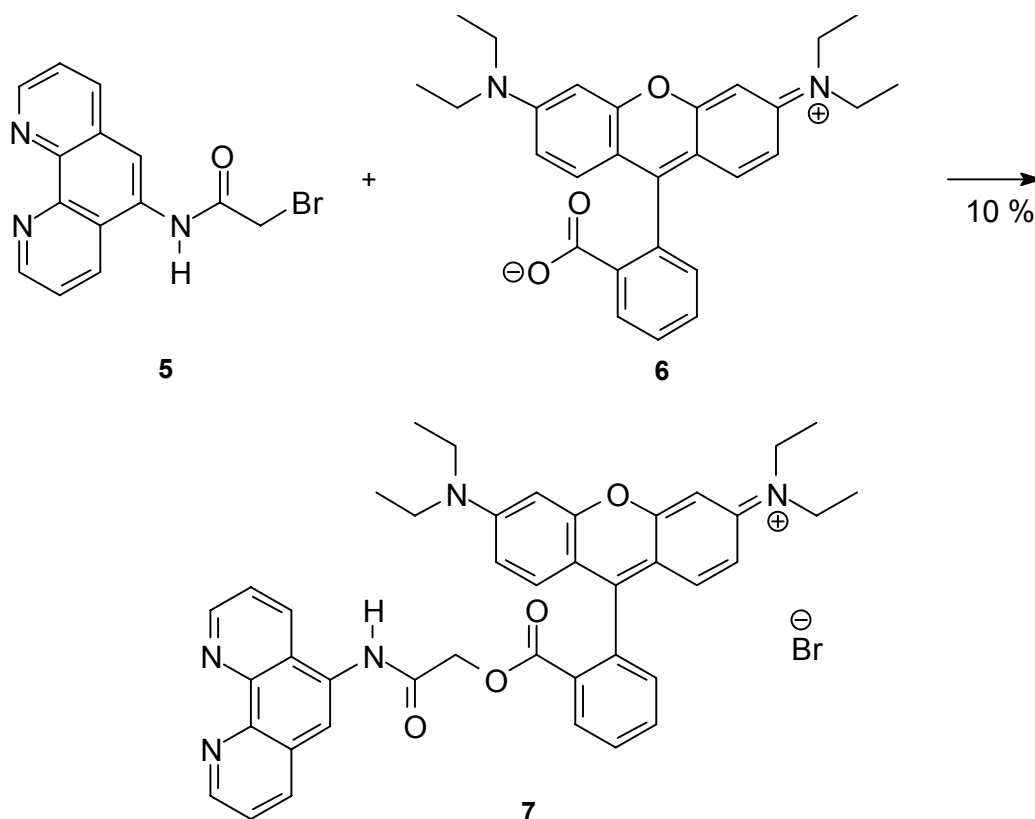


Zur Anbindung des modifizierten Chelatliganden **3** an das kommerziell erhältliche Bromacetyl bromid (**4**) wurden die Edukte ohne Basenzugabe zur Reaktion gebracht. 2-Brom-*N*-1,10-phenanthrolin-5-ylacetamid (**5**) fiel dabei in Form des Hydrobromids als Feststoff an und konnte nach basischer Aufarbeitung isoliert werden. Eine zusätzliche Basenzugabe während der Reaktion konnte entfallen, da hier das

Gleichgewicht durch steten Entzug des Reaktionsproduktes aus der Reaktionslösung auf die Produktseite verschoben wurde.

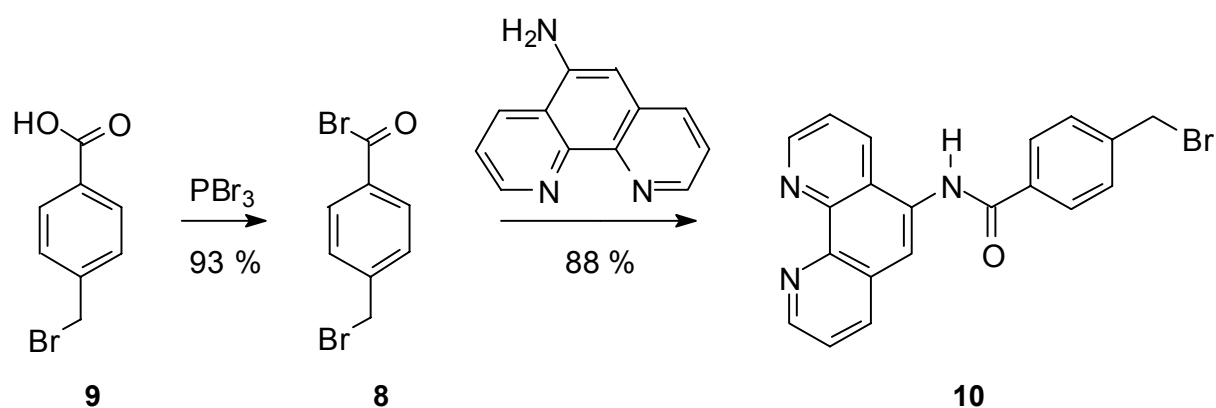


Die Darstellung von Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (**7**) gelang durch Umsetzung von Amid **5** mit Rhodamin B Base (**6**). Die Reaktion wurde nach einer Reaktionszeit von 67 Stunden abgebrochen, da mittels dünnschichtchromatographischer sowie NMR-spektroskopischer Kontrolle des Reaktionsverlaufs keine weitere Umsetzung mehr zu beobachten war. Während der Reaktion wurde das Bromidion des Amids **5** nukleophil durch Rhodamin B (**6**) am Carboxylatrest substituiert. Bromid bleibt als Gegenion des kationischen Fluoreszenzindikators **7** erhalten. Die Ausbeute an Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (**7**) betrug lediglich 10 %. Eine Ausbeuteerhöhung gelang weder durch Variation der Reaktionsbedingungen noch durch Veränderung des säulenchromatographischen Reinigungsprozesses in Bezug auf Lösungsmittel und Säulenmaterial.



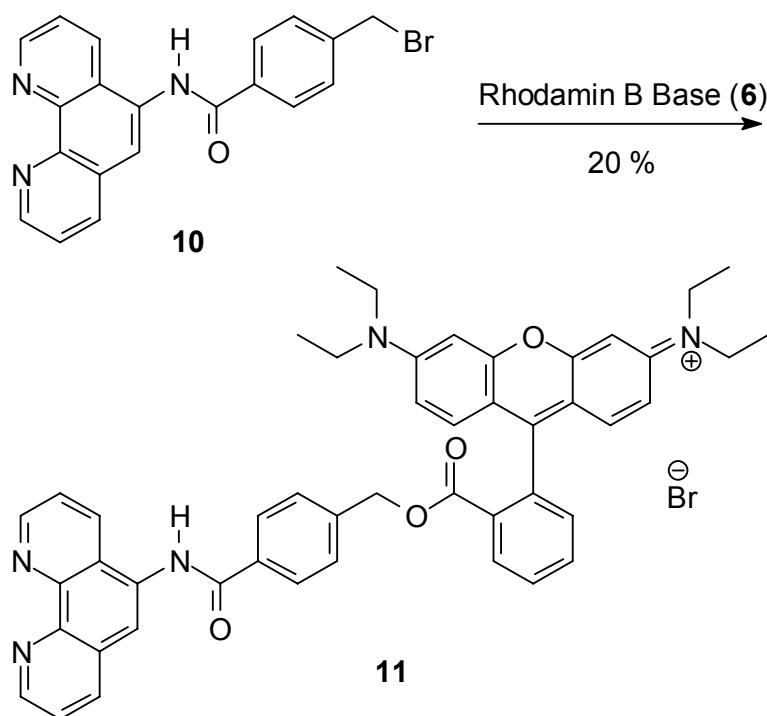
Der Ersatz von Bromacetyl bromid (**4**) durch 4-Brommethyl-benzoylbromid (**8**) erforderte zunächst die Umsetzung der kommerziell erhältlichen 4-Brommethylbenzoesäure (**9**) mit Phosphortribromid.^[115]

Die darauffolgende Darstellung von 4-(Brommethyl)-N-(1,10-phenanthroline-5-yl)benzamid (**10**) aus 1,10-Phenanthroline-5-amin (**3**) und 4-Brommethyl-benzoylbromid (**8**) erfolgte in der für das Amid **5** bewährten Vorgehensweise.



Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthroline-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) wurde in Analogie zu der Synthese von Indikator **7** in der nachfolgenden Kupplungsreaktion

von Amid **10** und Fluorophor **6** gebildet. Die Isolierung des Produktes **11** gelang auch in diesem Fall nach säulenchromatographischer Reinigung.

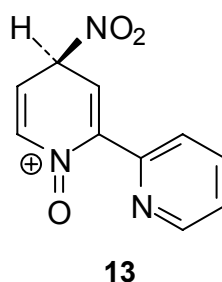


Nachfolgend wurde der Einbau einer Ligandeneinheit mit im Vergleich zu 1,10-Phenanthrolin (**1**) geringerer Affinität zu Fe^{2+} -Ionen angestrebt. Zunächst sollte 1,10-Phenanthrolin (**1**) durch 2,2'-Dipyridyl (**12**) ersetzt werden.

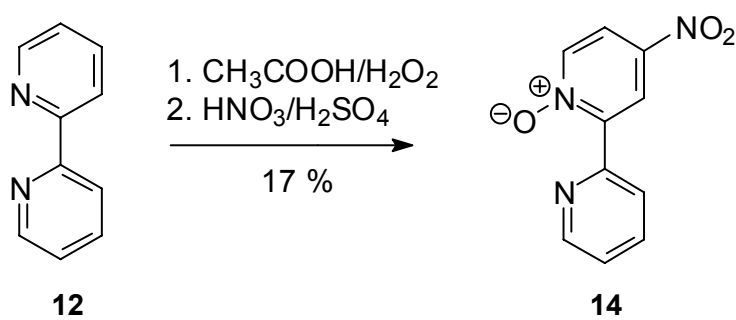
Zur Modifikation von 2,2'-Dipyridyl (**12**) durch Einführung einer Nitrogruppe muss zuvor am Stickstoffatom oxidiert werden. 2,2'-Dipyridyl (**12**) wurde unter Verwendung von Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel nach literaturbekannter Methode zum 2,2'-Bipyridin-1-oxid umgesetzt.^[116] Im Rohproduktgemisch waren stets beachtliche Mengen von Edukt **12** und 2,2'-Bipyridin-1,1'-dioxid enthalten. Optimierungsversuche durch Variation der Bedingungen ergaben stets einen erhöhten Anteil an nicht umgesetztem 2,2'-Dipyridyl (**12**) und/oder *N,N'*-Dioxid in der Rohproduktmischung.

Das Rohproduktgemisch wurde zur Vermeidung weiterer Ausbeuteverluste direkt in der nachfolgenden Nitrierung eingesetzt. Die Einführung der Nitrogruppe gelang in 4-Position des oxidierten Aromaten.^[117, 118] Als Nebenprodukte traten lediglich die durch die Oxidation bedingten 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1,1'-dioxid und 4,4'-Dinitro-2,2'-bipyridin-1,1'-dioxid auf. Die elektrophile Substitution an anderen Ringpositionen wurde nicht beobachtet. Die Beteiligung des Sauerstoffatoms am π -Elektronen-

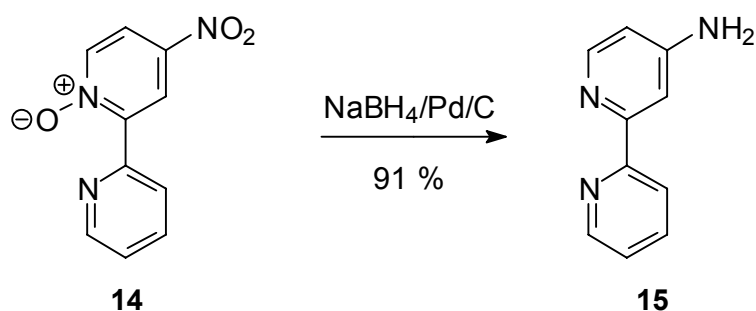
system des resultierenden Zwischenprodukts der Reaktion sollte dafür ausschlaggebend sein. Kennzeichnend ist hier die Grenzstruktur **13**.



4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (**14**) wurde nach basischer Aufarbeitung erhalten.

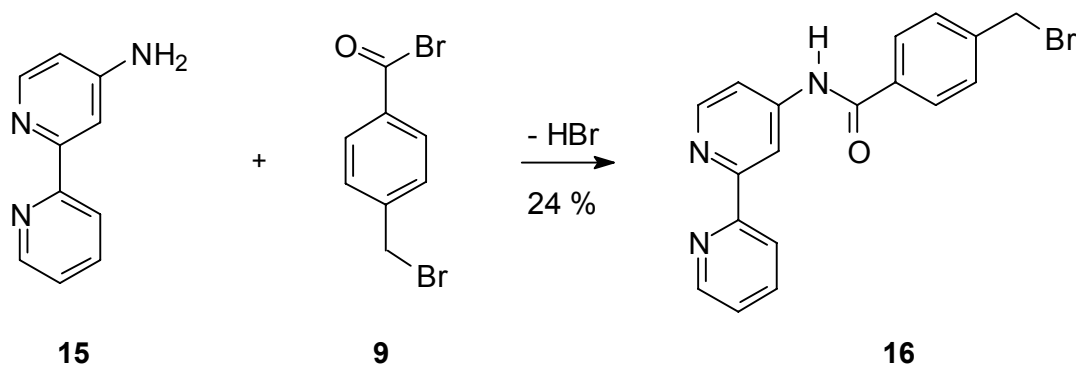


Die Darstellung von 2,2'-Bipyridin-4-amin (**15**) gelang durch Reduktion von 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (**14**) mit Natriumborhydrid unter Verwendung katalytischer Mengen von Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd).^[117]

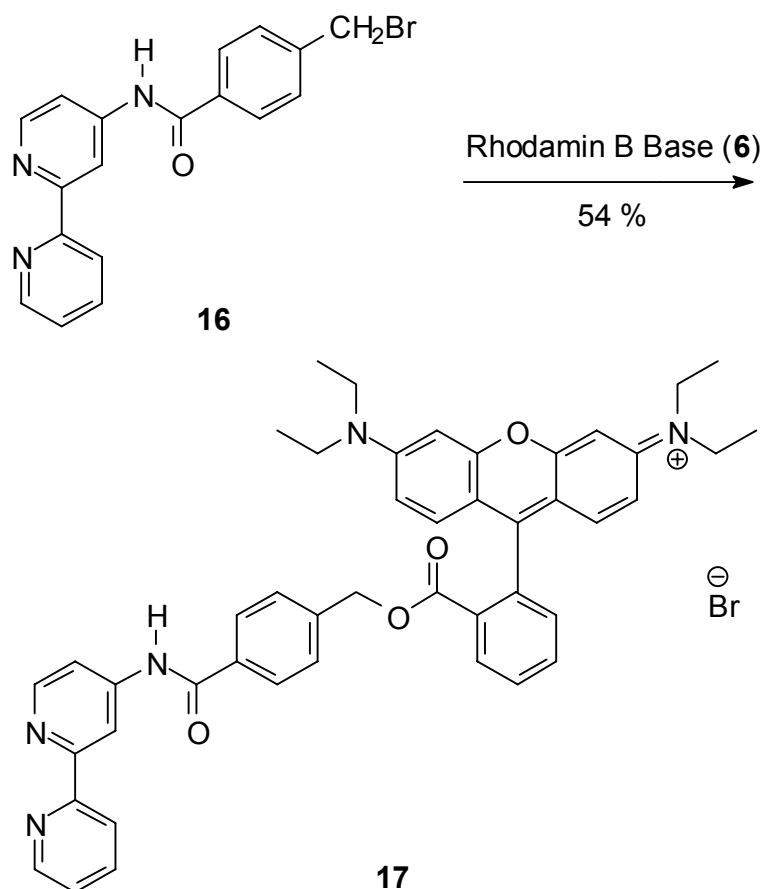


Zur Synthese von *N*-(2,2'-Bipyridin-4-yl)-4-(brommethyl)benzamid (**16**) wurden 2,2'-Bipyridin-4-amin (**15**) und 4-Brommethyl-benzoylbromid (**8**) zur Reaktion gebracht. Nach basischer Aufarbeitung des resultierenden Feststoffes musste im Gegensatz zu den bereits besprochenen äquivalenten Synthesen der Amide **5** und

10 eine säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes angeschlossen werden.

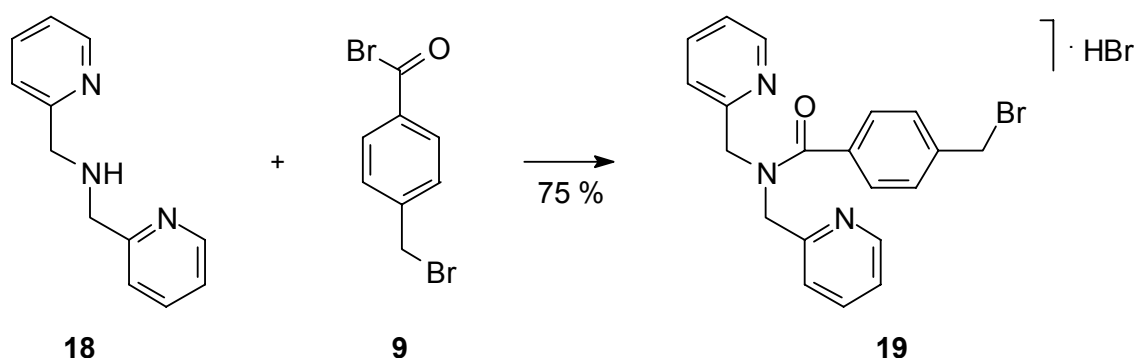


Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) wurde daraufhin analog zu den vorangegangenen Synthesen der Indikatoren **7** und **11** durch Umsetzung von Rhodamin B Base (**6**) und *N*-(2,2'-Bipyridin-4-yl)-4-(bromomethyl)benzamid (**16**) dargestellt.

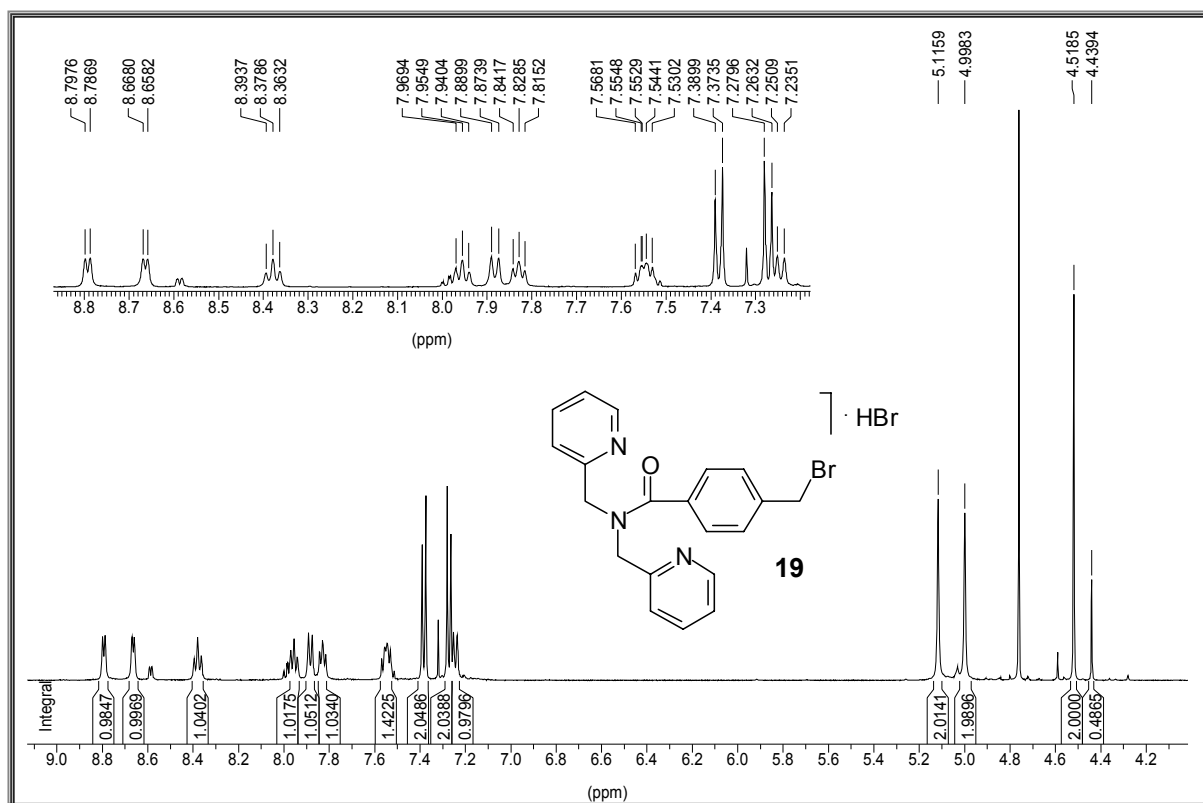
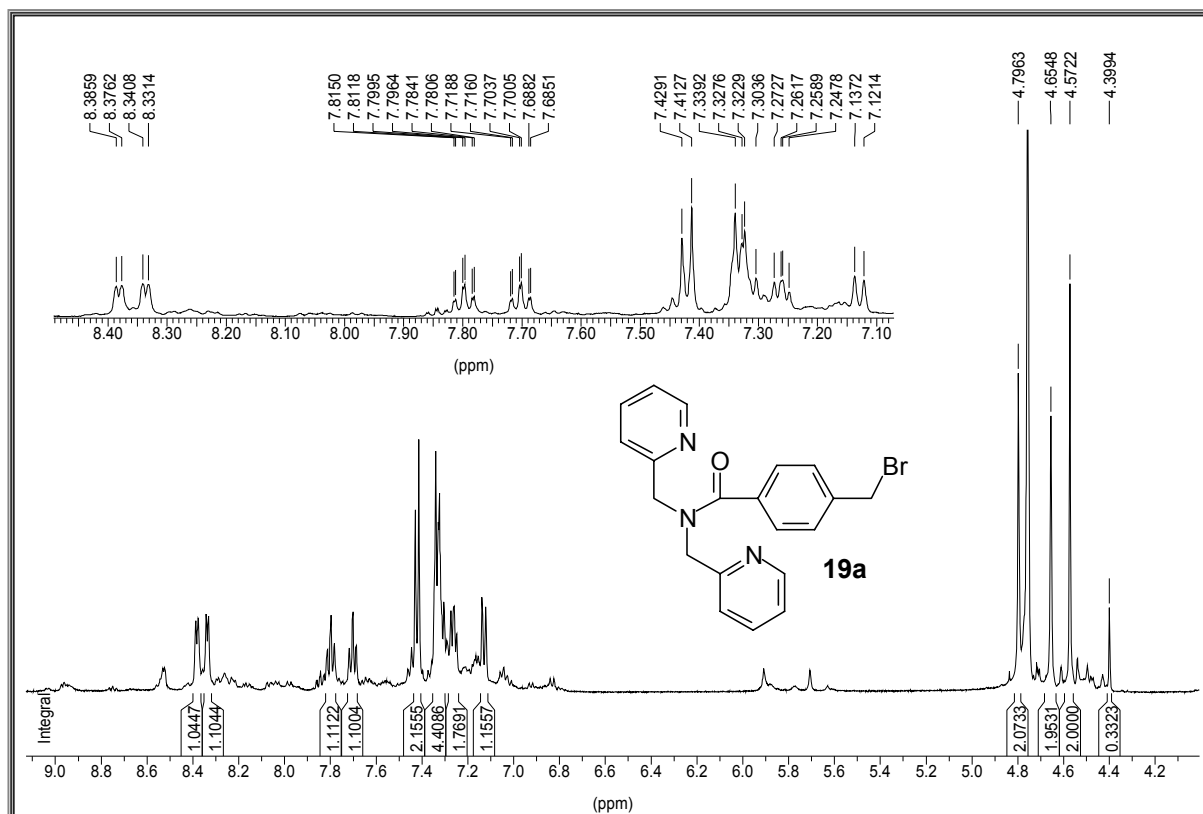


Im nächsten Schritt sollte der Ersatz der bislang eingesetzten Chelatorbausteine 1,10-Phenanthrolin (**1**) bzw. 2,2'-Dipyridyl (**12**) durch *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**) die Affinität des resultierenden Indikators für Fe^{2+} -Ionen noch weiter herabsetzen.

Die Kupplung des kommerziell erhältlichen, nunmehr sekundären Amins **18** an den Abstandshalter 4-Brommethyl-benzoylbromid (**9**) sollte gleichermaßen durch Amidbildung gelingen. Zur Darstellung von 4-(Brommethyl)-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid (**19**) wurden *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**) und 4-Brommethyl-benzoylbromid (**9**) in Anlehnung an eine Literaturvorschrift^[19] jedoch ohne Verwendung einer zusätzlichen Base zur Reaktion gebracht. Wie erwartet, schied sich aus der Reaktionslösung das Hydrobromid **19** ab. Da jedoch während der bewährten basischen Aufarbeitung Zersetzungserscheinungen dieses Feststoffes zu beobachten waren, wurde diese ausgesetzt.



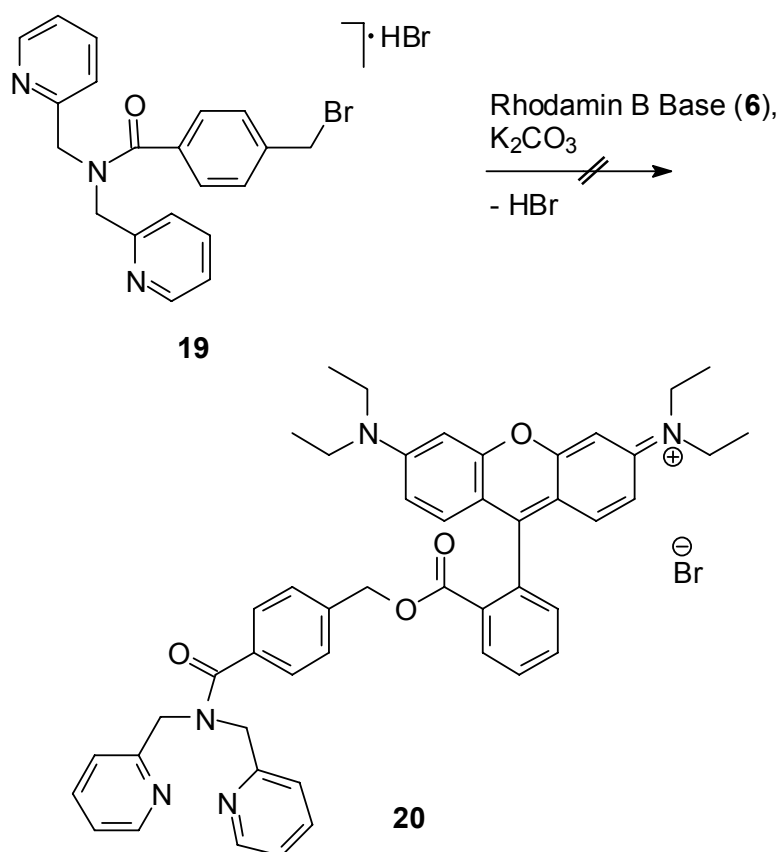
Auch ein Vergleich der NMR-Spektren des anfallenden Feststoffes vor und nach Basenzugabe ließ - abgesehen von den durch die Freisetzung des Amids **19a** veränderten chemischen Verschiebungen - auf eine Zersetzung des Hydrobromids **19** im basischen Milieu schließen (Abbildungen 12 und 13).

Abbildung 12: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) des Hydrobromids **19** in D_2O .Abbildung 13: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von **19a** in D_2O nach Zugabe von NaOD.

Beide Abbildungen zeigen - abgesehen von Verunreinigungen - der Zielverbindung entsprechende ^1H -NMR-Spektren: Aufgrund eingeschränkter Rotation um die Amidbindung sind drei verschiedene CH_2 -Gruppen sowie 12 aromatische Protonen mit erwarteter Aufspaltung zu erkennen. Nach Basenzugabe erfolgte jedoch die Zunahme von Signalen nicht identifizierter Zersetzungsprodukte.

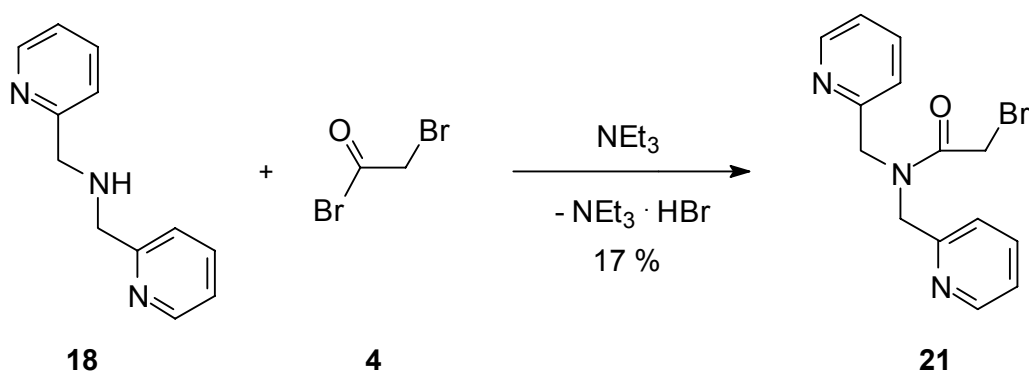
Eine Isolierung der Zielverbindung 4-(Brommethyl)-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)-benzamid (**19a**) gelang weder nach basischer Aufarbeitung des Hydrobromids noch durch direkten Basenzusatz zur Reaktionsmischung.

Da sich die Isolierung des freien Amids **19a** als nicht unproblematisch erwies, sollte die Darstellung von Rhodamin B-4-[bis(pyridin-2-yl-methyl)aminocarbonyl]benzylester (**20**) durch direkte Kupplung von Hydrobromid **19** mit Rhodamin B (**6**) unter Basenzusatz erfolgen. Es wurden Syntheseveruche unter verschiedenen Reaktionsbedingungen vorgenommen, der gewünschte Fluoreszenzindikator **20** konnte jedoch nicht isoliert werden.

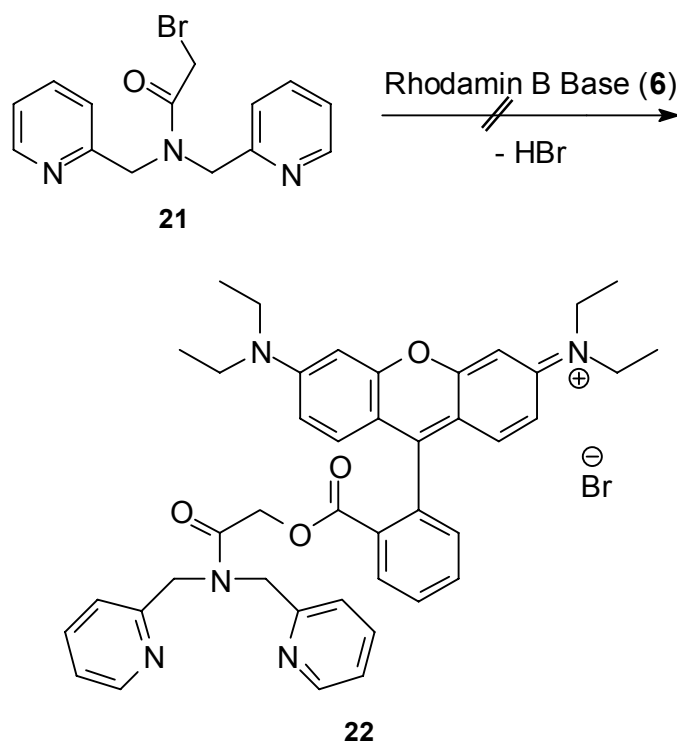


Ersatzweise sollte die Anbindung des Chelators *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**) an Bromacetyl bromid (**4**) erfolgen.

Die Darstellung von 2-Brom-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)acetamid (**21**) gelang durch direkten Zusatz von Triethylamin zur Reaktionsmischung. Das Rohprodukt konnte mittels Flash-Chromatographie vom größten Teil der Verunreinigungen befreit werden. Auch hier musste jedoch ein Kompromiss zwischen minimaler Verweilzeit auf der Säule und gutem Trennergebnis gefunden werden.



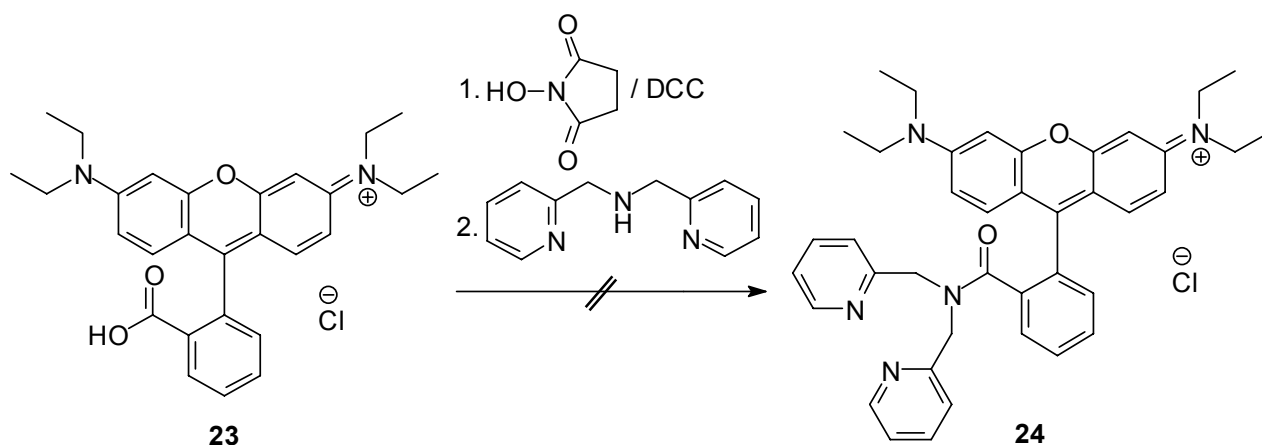
Die Substitution des Bromidions der Verbindung **21** durch Rhodamin B Base (**6**) sollte in bewährter Vorgehensweise zu Verbindung Rhodamin B-[(bis(pyridin-2-yl-methyl)aminocarbonyl)methylester] (**22**) führen.



Weder dünnschichtchromatographisch noch NMR-spektroskopisch war bei verschiedenen Reaktionszeiten die Bildung des Produktes **22** nachzuweisen.

Als Herstellungsmethode für derartige Fluoreszenzindikatoren könnte auch die direkte Umsetzung von Chelator und Fluorophor ohne Verwendung einer Spacereinheit geeignet sein. Bleiben Vorbehalte in Bezug auf die biologische Anwendbarkeit eines solchen Indikators einmal außer acht, besteht durchaus die Möglichkeit, durch Reaktion von *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**) mit Rhodamin B Hydrochlorid (**23**) einen Fluoreszenzindikator zum Nachweis von Fe^{2+} -Ionen erfolgreich zu synthetisieren.

In Anlehnung an literaturbekannte Amidsynthesen^[120-122] unter Verknüpfung einer Carbonsäurefunktion mit einem sekundären Amin sollte zunächst eine Aktivierung der Säurefunktion des Fluorophors **23** stattfinden. In Anlehnung an die Methode von Adamczyk *et al.*^[123] wurde Rhodamin B Hydrochlorid (**23**) mit Hilfe von *N*-Hydroxysuccinimid in Anwesenheit von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zum Succinimidylester umgesetzt. Nach Abtrennen des anfallenden Dicyclohexylharnstoffes wurde das aktivierte Fluorophor in üblicher Vorgehensweise ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Amidsynthese eingesetzt. Trotz Variation der Reaktionsbedingungen wiesen weder dünnschichtchromatographische noch NMR-spektroskopische Untersuchungen der jeweiligen Reaktionsmischungen auf die Bildung von Rhodamin B-*[N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)]amid (**24**) hin.



Die Darstellung eines Fluoreszenzindikators mit der Chelatereinheit *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**), die im Vergleich zu 1,10-Phenanthrolin (**1**) und 2,2'-Dipyridyl (**12**) die geringste Affinität zu Fe^{2+} -Ionen aufweisen sollte, wurde damit aufgegeben.

Der Chelator *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**) schien für eine Umsetzung unter den gewählten Bedingungen nicht ausreichend stabil.

Mittels vorstehend beschriebener Methoden war es somit gelungen, die potentiellen Fluoreszenzindikatoren Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (**7**), Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) sowie Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) erfolgreich zu synthetisieren. Alle Verbindungen wurden mittels üblicher Analysemethoden eindeutig identifiziert. Die entsprechenden Ergebnisse sind im experimentellen Teil dieser Abhandlung nachzulesen. Die isolierten Verbindungen **7**, **11** und **17** können in festem Zustand bei einer Temperatur von – 20°C unter Lichtausschluss über einen längeren Zeitraum (> sechs Monate) gelagert werden, ohne Zersetzungerscheinungen aufzuweisen.

5 UNTERSUCHUNG DER POTENTIELLEN FLUORESZENZSONDEN IM ZELLFREIEN SYSTEM

Zunächst waren die Charakteristika der potentiellen Fluoreszenzindikatoren **7**, **11** und **17** im zellfreien System zu analysieren. Zu untersuchen waren die UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenzindikatoren in Ab- und Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen, die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Indikatorkonzentration, die Bindungsstöchiometrie des Indikator/ Fe^{2+} -Komplexes, der Einfluss anderer intrazellulär relevanter Kationen neben Fe^{2+} auf die Indikatorfluoreszenz sowie die Beeinflussung der Fluoreszenz bzw. der Eisen-induzierten Löschung der Fluoreszenz von RPA durch Änderungen anderer biologischer Einflussfaktoren (pH-Wert, Ionenstärke, zelluläre Chelatoren wie Citrat und ATP in für das zelluläre System relevanten Größenordnungen). All diese Faktoren sind im Hinblick auf eine mögliche Eignung der Indikatoren zum quantitativen Nachweis intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens in intakten Zellen bzw. für die zu seiner Bestimmung notwendigen *ex situ*-Kalibrierung zu klären. Die Untersuchungen der Eigenschaften von Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (**7**) und zum Teil von Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) wurden im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Dr. H. de Groot (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen) von Herrn Dr. Frank Petrat durchgeführt.

5.1 Das Fluoreszenzverhalten in Ab- und Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen

Das Prinzip der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmungsmethode basiert auf der raschen Fluoreszenzlöschung als Ergebnis der Interaktion des Indikators mit chelatisierbarem Eisen. Aus diesem Grund wurde das Fluoreszenzverhalten der Indikatoren in Ab- und Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen in der entsprechenden Indikatorlösung untersucht.

Die Absorptions- und Emissionsspektren der Indikatoren **7**, **11** und **17** wurden in schwermetallfreier^J, Tris/HCl-gepufferter, wässriger Lösung mit einem anwendungsbezogenen, dem intramitochondrialen Milieu entsprechenden pH-Wert von 8.2 und unter Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) als Lösungsvermittler^K aufgenommen. Wie erwartet, stimmten die erhaltenen Spektren in ihrer Lage und Form mit denen des verwendeten Fluorophors Rhodamin B überein. In Abbildung 14 sind Absorptions- und Emissionsspektrum von Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)-aminocarbonyl]benzylester (**11**) beispielhaft aufgeführt.

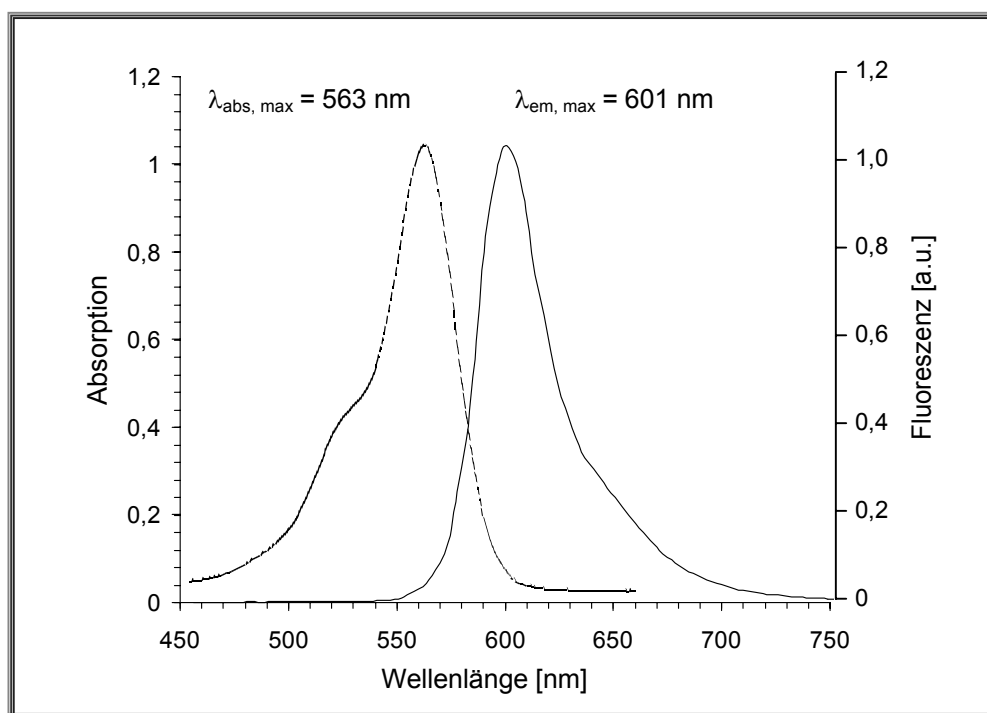


Abbildung 14: Absorptions- (---) und Emissionsspektrum (—) von Indikator **11** (10.0 μM , 10.0 mM Tris/HCl, pH = 8.2, 0.18 % w/v SDS, 22 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 563 \text{ nm}$).

^J Für die Untersuchungen im zellfreien System wurden alle verwendeten Messlösungen zunächst mit dem Schwermetallkomplexbildnerharz Chelex 100 behandelt, um Schwermetallkontaminationen aus der Lösung zu entfernen.[124]

^K Der Zusatz eines Lösungsvermittlers war für die Untersuchungen im zellfreien System unerlässlich. Im Gegensatz zu den später im zellulären System eingesetzten sehr geringen Konzentrationen der Indikatoren ist ihre Löslichkeit bei Konzentrationen von 5.00 bis 100 μM in wässriger Pufferlösung unzureichend. Nach Auswertung zahlreicher Untersuchungen erwies sich das anionische SDS als optimales Tensid. Der prozentuale Anteil an SDS in der Lösung wurde so gewählt, dass die Fluoreszenzindikatoren vollständig gelöst vorlagen und eine Beeinträchtigung der Messungen durch Mizellenbildung ausgeschlossen werden konnte. Die kritische Mizellenkonzentration von SDS in Wasser hat einen Wert von 0.23 % bzw. 8.00 mM.[125]

In Tabelle 4 sind die jeweiligen Maxima der Absorptions- und Emissionsspektren der verschiedenen Indikatoren angegeben. Die Fluoreszenzindikatoren sind damit ausnahmslos im vorteilhaften, langwelligen Bereich anregbar und der u. a. in der Laser-Scanning-Mikroskopie eingesetzte Helium/Neon-Laser ist mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ sehr gut zur Anregung der Fluoreszenzindikatoren geeignet. Die Zugabe des für die nachfolgenden zellulären Messungen unentbehrlichen Entquenchers PIH führte in keinem Fall zu einer merklichen Verschiebung von Absorptions- oder Emissionsmaximum.

Tabelle 4: Maxima der Absorptions- und Emissionsspektren der Indikatoren **7**, **11** und **17**^{a)}

Indikator	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
7	556 nm	592 nm
11	563 nm	601 nm
17	562 nm	598 nm

^{a)} 10.0 μM Indikatorkonzentration, 10.0 mM Tris/HCl, pH = 8.2, 0.18 % w/v SDS, 22 °C, λ_{exc} entspricht jeweils dem Absorptionsmaximum

Bei schrittweiser Zugabe einer wässrigen Eisen(II)ammoniumsulfat/Trinatriumcitrat-Lösung^L wurde die Fluoreszenzintensität der entsprechenden Indikatorlösung stufenweise herabgesetzt, wobei keine Verschiebung des Emissionsspektrums beobachtet wurde. Abbildung 15 veranschaulicht die Veränderung des Emissionsspektrums am Beispiel von Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]-benzylester (**17**).

^L Eisen(II)ammoniumsulfat-Hexahydrat, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Mohr'sches Salz), wurde aufgrund seiner ausgesprochen guten Beständigkeit gegenüber Luftsauerstoff ausgewählt. Dennoch erfolgen die Messungen unter Eisen(II)zugabe stets in Gegenwart eines großen Überschusses an Ascorbinsäure als Reduktionsmittel, um die mögliche Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} durch Luftsauerstoff zu verhindern.

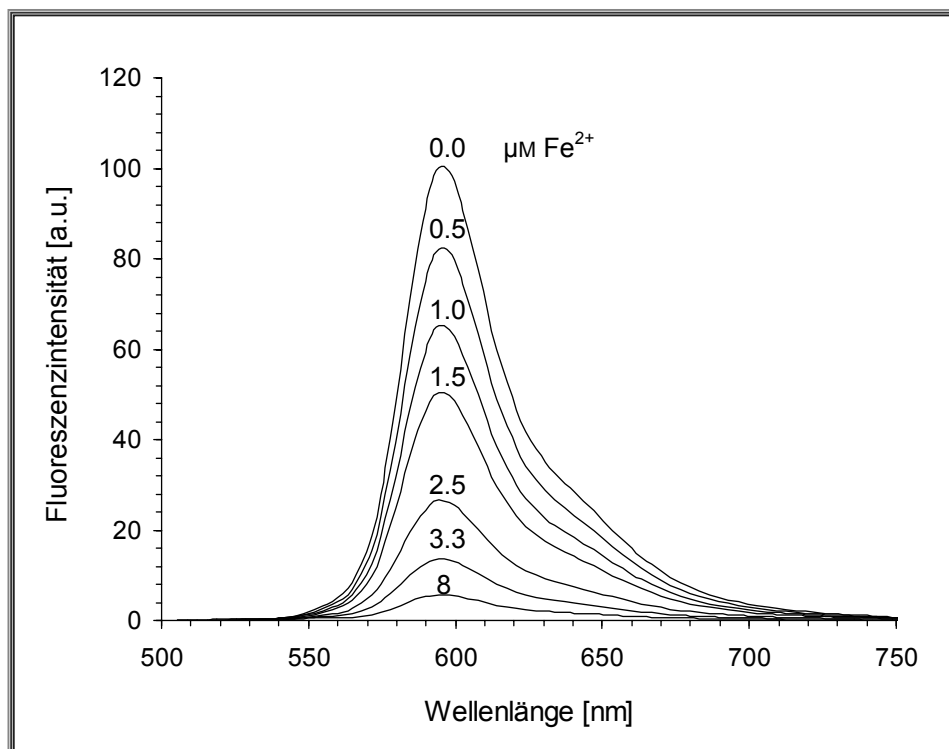


Abbildung 15: Emissionsspektrum von Indikator **17** (10.0 μM , 2.00 mM Ascorbinsäure, 0.18 % w/v SDS, 10.0 mM Tris/HCl, pH = 8.2, 22 °C, λ_{exc} = 562 nm) in Anwesenheit von 0.00 bis 8.00 μM Fe^{2+} (H_2O , 1.00 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1.00 mM Na-Citrat, 20.0 mM Ascorbinsäure).

Alle Indikatoren entsprechen bzgl. ihrer in einer Fluoreszenzlöschung resultierenden eisenchelatisierenden Eigenschaft den genannten Erwartungen. Das Fluoreszenzverhalten in Ab- und Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen verspricht damit für alle drei Indikatoren eine potentielle Eignung als Fluoreszenzsonde zum Nachweis von chelatisierbaren Fe^{2+} -Ionen.

5.2 *Ex situ*-Kalibrierungen

Aufgrund der vorgenannten Nachteile einer *in situ*-Kalibrierung wurde kürzlich von Petrat *et al.*^[13] eine Methode zur *ex situ*-Kalibrierung mittels quantitativer Laser-Scanning-Mikroskopie entwickelt. Diese Kalibrierungsmethode ist für die quantitative Bestimmung intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens unerlässlich, da die Konzentration chelatisierbaren Eisens anhand der Konzentrationsdifferenz des Eisen-freien und damit fluoreszierenden Indikators vor und nach Zugabe eines

zweiten membranpermeablen Chelators und somit aus dem Anstieg der Fluoreszenzintensität, berechnet werden soll. Aus diesem Grund muss die Differenz zwischen der intramitochondrialen Fluoreszenz vor und nach der vollständigen Entquenchung direkt proportional von der intramitochondrialen Konzentration chelatisierbarer Eisenionen abhängen, solange die intramitochondriale Indikatorkonzentration nicht limitierend ist.

Um in zellulären Anwendungen von der intramitochondrialen Fluoreszenzintensität des Indikators auf die Farbstoffkonzentration schließen zu können, war zunächst die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Farbstoffkonzentration sicherzustellen. Ein linearer Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und der Konzentration der entsprechenden Lösung besteht nur, wenn die Extinktion $E = \varepsilon cd$ kleiner als etwa 0.01 ist. In diesem Fall geht Gleichung 13 (Kapitel 1.6.1) in die lineare Funktion

$$F = 2.3 \Phi_F I_0 \varepsilon cd \quad (14)$$

über.^[126] Diese fundamentale Beziehung der quantitativen Fluoreszenzmessung ist nur bei hinreichend verdünnten Lösungen und geringen Schichtdicken erfüllt. Bei erfüllter Linearität werden somit die vornehmlich bei allen nicht-konfokalen Messmethoden auftretenden Selbstquenchungseffekte der Fluoreszenzindikatoren bei den durch die Akkumulation erwarteten, relativ hohen intramitochondrialen Indikatorkonzentrationen ausgeschlossen und eine Kalibrierungsmöglichkeit ist bei Einhaltung identischer Bedingungen für die Probenmessung gegeben.

Die erforderlichen Fluoreszenzmessungen wurden auch in diesem Fall in einfacher, gepufferter Lösung (Tris/HCl, pH = 8.2) sowie in einem der mitochondrialen Matrix nachempfundenen Medium^M bei 37 °C unter Verwendung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die erwartete lineare Abhängigkeit für Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**).

^M Die genaue Zusammensetzung dieses „mitochondrialen“ Mediums ist im experimentellen Teil in Kapitel 11.4 aufgeführt.

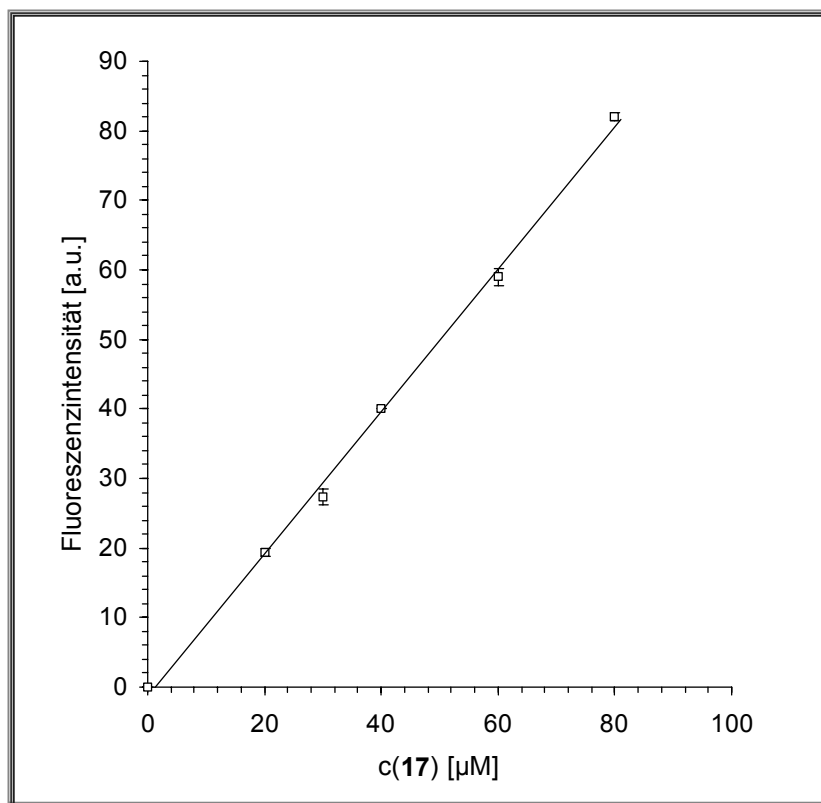


Abbildung 16: Lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration am Beispiel von Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) gemessen am Laser-Scanning-Mikroskop (10.0 mM Tris/HCl, pH = 8.2, 0.18 % w/v SDS, 37 °C, 2.00 mM Ascorbinsäure, $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Messwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Farbstoffkonzentration war somit im intramitochondrial maßgeblichen Konzentrationsbereich für die drei Indikatoren Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (**7**), Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) gegeben.

Um eine geeignete *ex situ*-Kalibrierung zu gewährleisten, musste als weiteres Kriterium eine konstante Bindungsstöchiometrie des jeweiligen Indikator/ Fe^{2+} -Komplexes sichergestellt werden. Die Messungen wurden sowohl in einfacher, gepufferter Lösung (Tris/HCl, pH = 8.2) als auch in „mitochondrialem“ Medium bei 37 °C durchgeführt. Dazu wurden Indikatorlösungen im intramitochondrial maßgeblichen Konzentrationsbereich mit einer Eisen(II)ammoniumsulfat/Trinatriumcitrat-Stammlösung titriert. Die Fluoreszenzintensität der Lösungen wurde bei konstanter Anregungswellenlänge am Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt. Da die Komplexbildung innerhalb von Sekunden erfolgt,^[127] reichte eine Reaktionszeit von

wenigen Minuten vor der Fluoreszenzmessung aus, um eine vollständige Ausbildung des Indikator/ Fe^{2+} -Komplexes zu gewährleisten. In Abbildung 17 ist die Fluoreszenzintensität gegen die Fe^{2+} -Ionenkonzentration für verschiedene Konzentrationen von **17** aufgetragen.

Für Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) wurden nahezu vergleichbare Abhängigkeiten erhalten. Für beide Fluoreszenzindikatoren besteht damit die für einfache 1,10-Phenanthrolin- bzw. 2,2'-Dipyridyl-Derivate zu erwartende Stöchiometrie von 3 : 1 auch für den hier verwendeten Indikator/ Fe^{2+} -Komplex, d. h. bei einem molaren Verhältnis von 3 (Indikator) : 1 (Fe^{2+}) ist die Indikatorfluoreszenz unabhängig von der gewählten Ausgangskonzentration der Fluoreszenzsonde vollständig gelöscht.

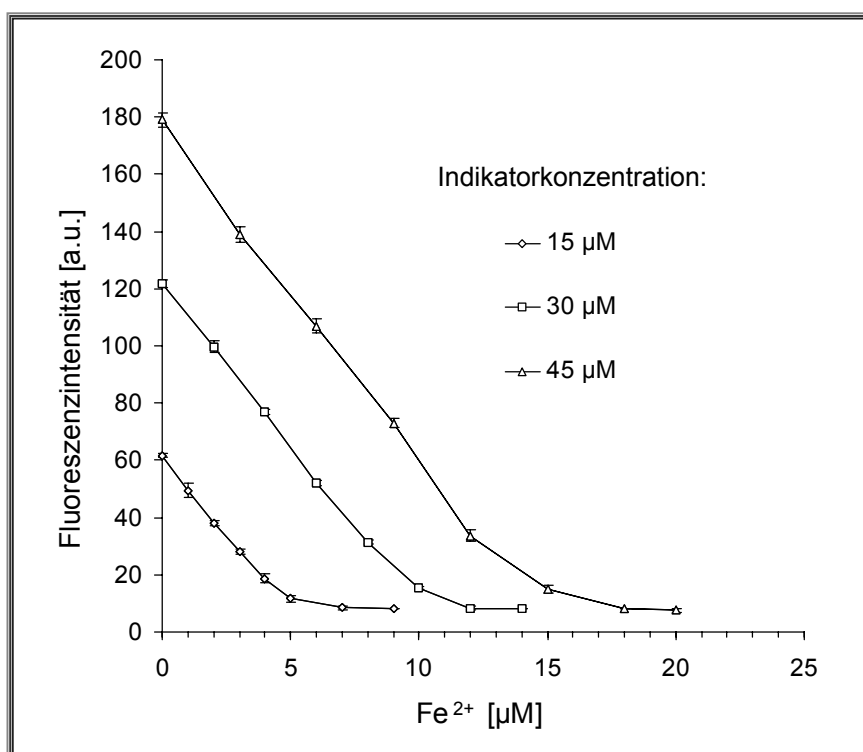


Abbildung 17: *Ex situ*-Kalibrierung der Fe^{2+} -induzierten Fluoreszenzlöschung von Indikator **17** am Laser-Scanning-Mikroskop (Messpuffer: 10.0 mM Tris/HCl, pH = 8.2, 0.18 % w/v SDS, 37 °C, 2.00 mM Ascorbinsäure; Fe^{2+} -Lösung: H_2O , 1.00 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1.00 mM Na-Citrat, 20.0 mM Ascorbinsäure; $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Messwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Für die Titrationsen der Indikatoren **11** und **17** in einfacher, gepufferter Lösung sowie in „mitochondrialem“ Medium wurden identische Ergebnisse erhalten. Daraus folgt, dass die Fluoreszenzlöschung und somit die Komplexbildung zwischen Indikator und Fe^{2+} -Ionen sowohl von intramitochondrial vorliegenden und möglicherweise konkurrierenden Ionen wie Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} als auch von anderen Bioliganden wie Citrat oder von veränderlicher Ionenstärke und Osmolarität unbeeinflusst sind.

Für Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonylmethylester (**7**) wurde jedoch in Abhängigkeit von der Indikatorkonzentration eine variable Bindungsstöchiometrie (2 : 1 bis 3 : 1) für den Indikator/ Fe^{2+} -Komplex gefunden. Einen qualitativen Erklärungsansatz liefert ein Vergleich der berechneten Strukturen der - abgesehen von den enthaltenen Spacermolekülen - strukturell gleichartigen Verbindungen **7** und **11** (Abbildungen 18 und 19).

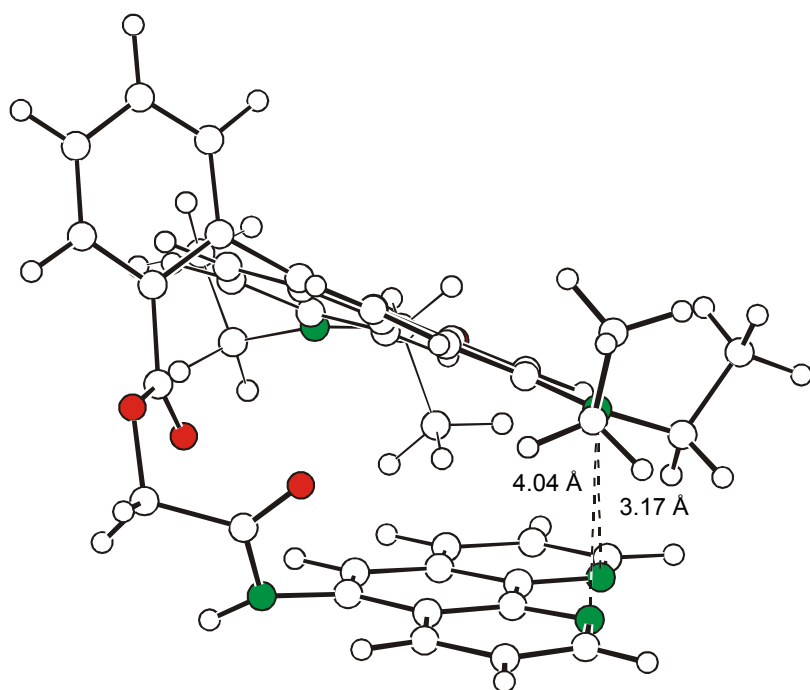


Abbildung 18: Energieminimierte Struktur von Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonylmethylester (**7**) (Molecular Modelling mit Macromodel 6.5, Amber*-Kraftfeld).

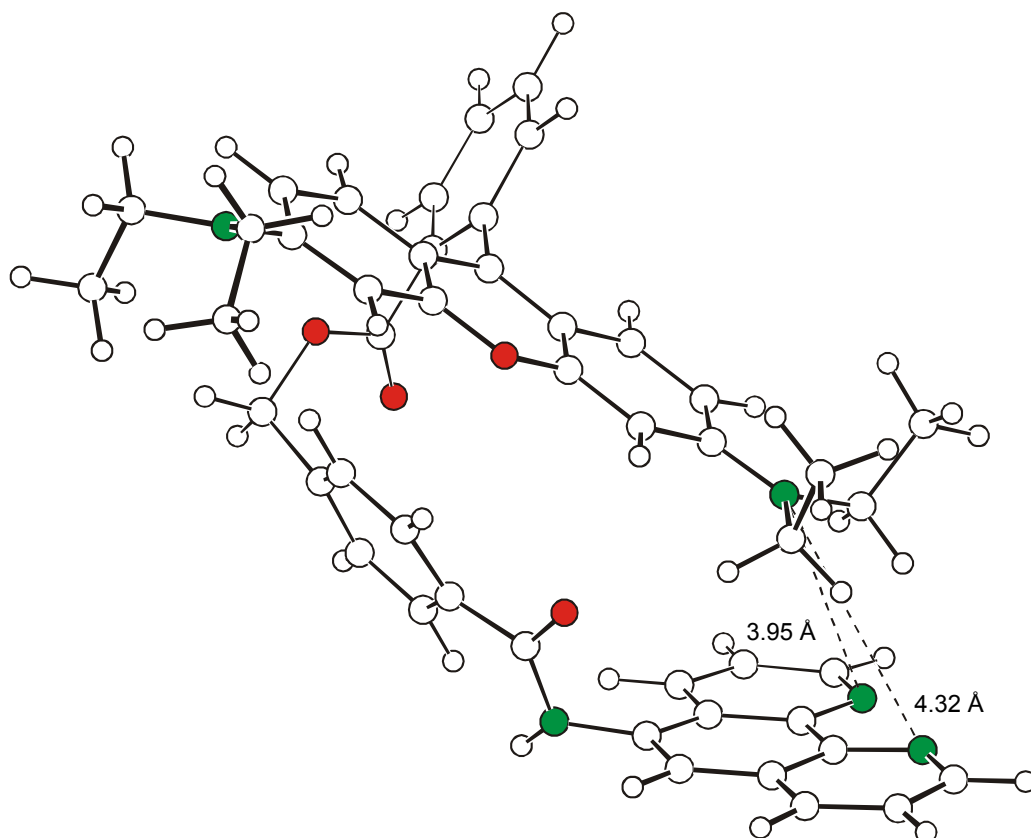


Abbildung 19: Energieminimierte Struktur von Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)-aminocarbonyl]benzylester (**11**) (Molecular Modelling mit Macromodel 6.5, Amber*-Krafftfeld).

Zur Ausbildung eines 3 : 1-Indikator/ Fe^{2+} -Komplexes muss die Phenanthrolin-Chelatereinheit möglichst „frei“ zugänglich sein, d.h. die Assoziation an das Fe^{2+} -Ion darf nicht durch andere Gruppen des Liganden gestört werden. Wie Abbildung 18 verdeutlicht, erlaubt jedoch die Flexibilität der in Indikator **7** verwendeten Spacereinheit Bromacetylbromid eine Orientierung der fluoreszierenden Einheit Rhodamin B in der Art, dass prinzipiell eine Koordination einer der Diethylamino-gruppen in axialer Position des oktaedrisch umgebenen Fe^{2+} -Zentrums ermöglicht wird; d. h. **7** kann als tridentater Ligand fungieren, resultierend in einer 2 : 1-Stöchiometrie des Komplexes. Die genannte Anordnung ist schematisch in Abbildung 20A veranschaulicht. Die wahrscheinlich enthalpisch günstigere Assoziation eines dritten 1,10-Phenanthrolin-Liganden wird in diesem Fall möglicherweise entropisch überkompensiert.

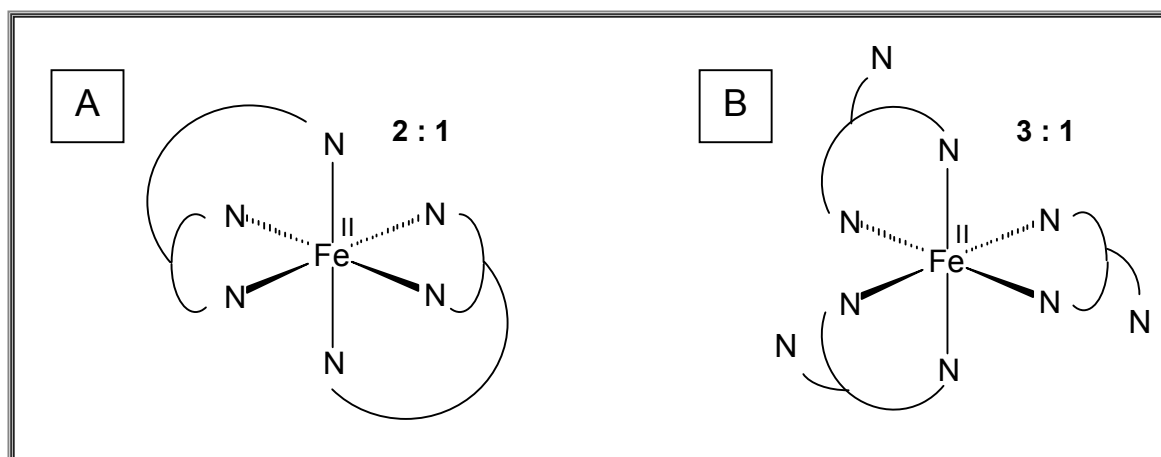


Abbildung 20: Koordination eines tridentaten (A) bzw. eines bidentaten Liganden (B) im Falle eines oktaedrischen Ligandenfeldes.

Die starre Geometrie der Einheit $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-\text{NH}-$ in Indikator **11** (Abbildung 19) erlaubt dagegen keine vorteilhafte Ausrichtung des Fluorophors in axialer Position, d. h. eine Koordination über die Diethylaminogruppierung wird hier energetisch ungünstig. Dementsprechend bildet **11** bevorzugt den erwarteten 3 : 1-Komplex aus (Abbildung 20B). Die variable Bindungsstöchiometrie im Falle des $7/\text{Fe}^{2+}$ -Komplexes deutet darauf hin, dass die freie Energie für die Komplexbildung entsprechend Abbildung 20A in vergleichbarer Größenordnung wie die Komplexbildung entsprechend Abbildung 20B liegt. Aus diesem Grund fehlt eine zuverlässige Kalibrierungsmöglichkeit und damit erweist sich Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (**7**) als Fluoreszenzsonde zur quantitativen Bestimmung des mitochondrialen chelatisierbaren Eisenpools als ungeeignet. Indikator **7** wurde deshalb für weitere Untersuchungen nicht mehr eingesetzt.

5.3 Untersuchungen zu biologisch relevanten Einflussfaktoren auf die Indikatorfluoreszenz

Neben den vorgenannten Experimenten zur *ex situ*-Kalibrierung musste zudem im zellfreien System sichergestellt werden, dass für eine intrazelluläre Fluoreszenzlösung keine anderen Ursachen als die Gegenwart von Fe^{2+} -Ionen in Frage kommen bzw. dass die Eisen-induzierte Quenchung nicht durch variable, zellspezifische Faktoren beeinflusst wird. So wurde der Einfluss verschiedener

möglicher „biologischer“ Einflussfaktoren auf die Indikatorfluoreszenz und auf deren Quenchung durch Fe^{2+} -Ionen untersucht.

Wie Tabelle 5 zu entnehmen ist, wird die Fluoreszenz der Indikatoren **11** und **17** neben Fe^{2+} von den im zellulären System relevanten Kationen lediglich noch durch Cu^{2+} und in geringem Maße auch durch Fe^{3+} , Co^{2+} und Ni^{2+} gelöscht. Intrazellulär liegen Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} und Ni^{2+} jedoch in so geringen Konzentrationen vor, dass ihr Einfluss auf die Indikatorfluoreszenz in zellulären Messungen vernachlässigt werden kann.

Tabelle 5: Einfluss biologisch relevanter Übergangsmetallionen auf die Fluoreszenzintensität der Indikatoren **11** und **17** im zellfreien System^{a)} (Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.)

Ion	Fluoreszenz von 11		Fluoreszenz von 17	
	(in % der Ausgangsfluoreszenz)			
	nach Zugabe von			
	2.00 μM	20.0 μM	2.00 μM	20.0 μM
Co ²⁺	87.0 ± 3.9	72.2 ± 3.0	89.1 ± 3.5	60.9 ± 0.5
Cu ⁺	96.4 ± 1.3	91.0 ± 2.5	94.6 ± 2.2	92.8 ± 0.4
Cu ²⁺ b)	76.3 ± 3.7	22.7 ± 2.6	82.4 ± 4.9	19.3 ± 3.5
Fe ²⁺	63.5 ± 2.9	4.5 ± 1.2	68.6 ± 6.9	8.4 ± 0.4
Fe ³⁺ b)	93.5 ± 4.3	87.9 ± 3.4	98.8 ± 1.6	89.6 ± 0.8
Mn ²⁺	96.6 ± 3.9	97.4 ± 3.5	96.6 ± 3.0	96.7 ± 1.8
Ni ²⁺	96.4 ± 2.6	77.5 ± 1.5	95.1 ± 4.0	65.0 ± 4.7
Zn ²⁺	95.9 ± 1.1	92.6 ± 0.5	99.2 ± 1.1	94.5 ± 2.5

^{a)} Indikatorkonzentration: 20.0 μM ; „mitochondriales“ Medium, pH = 8.2, 0.15 % w/v SDS für **11**, 0.18 % w/v SDS für **17**, 37 °C; Metallsalz-Lösung: H_2O bzw. 1.00 M HCl für Cu^{+} (Die Messungen zu Indikator **11** wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Frank Petrat durchgeführt.)

^{b)} Messungen in Abwesenheit von Reduktionsmitteln

Sowohl für die Indikatorfluoreszenz als auch für die Eisen-induzierte Löschung der Fluoreszenz wurden übereinstimmende Ergebnisse für das einfache, gepufferte

Medium und das „mitochondriale“ Medium erhalten. Dies impliziert zum einen, dass biologisch relevante Eisenchelatoren in der mitochondrialen Matrix, wie Citrat und ATP, nicht mit der Eisen-chelatisierenden Phenanthrolin-Komponente der Indikatoren **11** und **17** konkurrieren können. Zum anderen wird dadurch gezeigt, dass auch die Ionenstärke, die Osmolarität und Konkurrenz-Ionen wie Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} keinerlei Einfluss auf die Indikatorfluoreszenz haben.

Der Einfluss einer Viskositätserhöhung^N des Mediums auf die Fluoreszenz bzw. deren Eisen-induzierte Löschung wurde durch Zugabe einer 1.75 M Saccharose-Lösung ermittelt. Sie bewirkte lediglich eine sehr geringe Erniedrigung der Fluoreszenzintensität von Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**). Diese geringfügige Abweichung lässt sich aber auch durch eine erhöhte Schwermetallkontamination des hochviskosen Mediums bedingt durch die schlecht durchzuführende Behandlung mit dem Komplexbildnerharz Chelex 100 erklären. Da der Einfluss einer Viskositätsänderung somit sehr gering, die Fluoreszenzmessungen in diesem hochviskosen Medium aber sehr störanfällig waren (Pipettierung etc.), wurde auf einen Zusatz von Saccharose bei dem überwiegenden Teil der Messungen verzichtet.

Der Einfluss von Schwankungen des pH-Wertes auf die Fluoreszenz bzw. die Eisen-induzierte Löschung der Fluoreszenz der genannten Indikatoren wurde im Bereich von 6.5 - 10.0^O durch Zugabe entsprechender Mengen 6.00 M Salzsäure geprüft. Auch für diesen Fall wurde keinerlei Effekt auf die Indikatorfluoreszenz festgestellt.

^N Die dynamische Viskosität η des Cytosols liegt in der Größenordnung um 2.1 cP. Für die Viskosität der mitochondrialen Matrix werden Werte bis zu 40 cP angegeben.[128]

^O Dieser pH-Bereich sollte Abweichungen des pH-Wertes im intramitochondrialen Matrixraum unter pathophysiologischen Bedingungen abdecken.

6 EINSATZ DER FLUORESZENZSONDEN IM ZELLULÄREN SYSTEM

In Anlehnung an die von Petrat et al.^[13] entwickelte Methode zum Nachweis von cytosolischem und nukleärem chelatisierbaren Eisen in intakten Zellen wurden nachfolgend die subzelluläre Verteilung der potentiellen Fluoreszenzsonden Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) bzw. Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) und ihre grundsätzliche Eignung zur Detektion intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens untersucht sowie die quantitative Bestimmung dieses Eisenpools in Rattenhepatozyten unter Verwendung konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie^P vorgenommen.

6.1 Die subzelluläre Verteilung der Fluoreszenzindikatoren

Unabdingbare Voraussetzung für die Untersuchung von intramitochondrialem chelatisierbaren Eisen ist die ausgeprägte und selektive Akkumulation des potentiellen Indikators innerhalb der mitochondrialen Matrix vitaler Zellen. Für die Indikatoren **11** und **17** konnte durch Colokalisation mit dem Mitochondrienmarker Rhodamin 123^Q eine selektiv intramitochondriale Lokalisation nachgewiesen werden. Die subzelluläre Verteilung der Indikatoren **11** und **17** wurde dazu anhand der intrazellulären Indikatorfluoreszenz nach Aufhebung der Fluoreszenzlöschung durch

^P Die verschiedenen Parameter der Fluoreszenzmessung am Laser-Scanning-Mikroskop wurden stets an die gestellten Anforderungen angepasst. Für qualitative Fluoreszenzmessungen wurden in der Regel lange Scan-Zeiten, eine bestmögliche Auflösung, hohe Laserleistungen und Zoomfaktoren verwendet. Für Colokalisationsuntersuchungen war vor allem die optische Trennung der Emissionsbereiche durch geeignete Filtersysteme zu gewährleisten. Quantitative Fluoreszenzmessungen erforderten hingegen neben der Auswahl eines repräsentativen Bildausschnittes bei einer durchschnittlichen Anzahl von 30 bis 40 Zellen auch die Berücksichtigung der photochemischen Schädigung von Indikator und Zellen. Hier mussten die Scanning-Parameter im Hinblick auf Detektorempfindlichkeit durch Signalverstärkung, Auswahl von Emissionsfiltern, Laserleistung, Expositionsdauer, Auflösung und Zoom optimiert werden.

^Q Das Fluoreszenzspektrum von Rhodamin 123 in Methanol zeigt folgende Maxima: $\lambda_{\text{exc, max}} = 505 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em, max}} = 534 \text{ nm}$.^[129]

Zugabe des Eisenchelators Pyridoxalisonicotinoylhydrazon (PIH) untersucht (Abbildung 21).^R

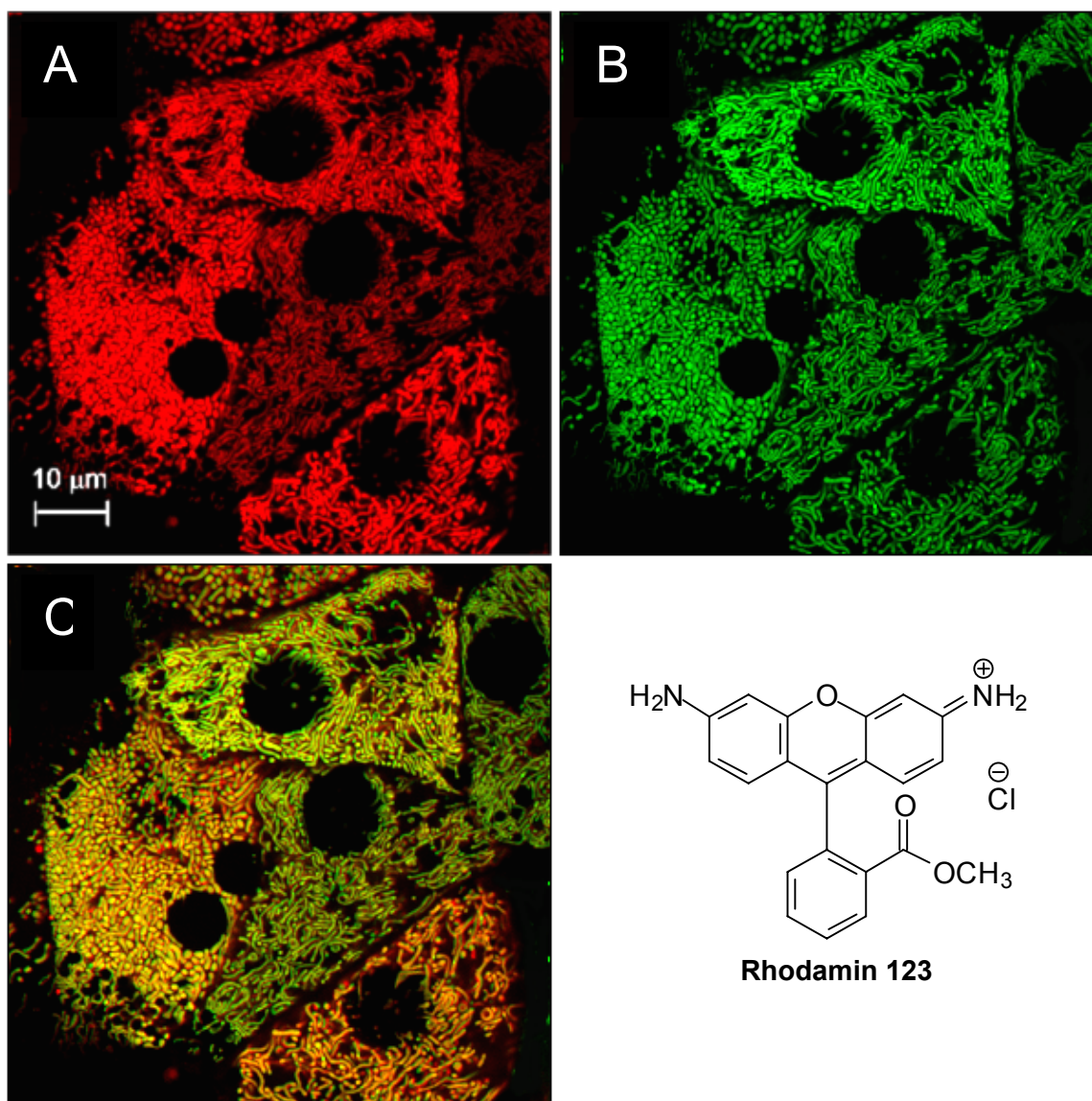


Abbildung 21: Selektiv intramitochondriale Lokalisation von Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) in kultivierten Rattenhepatozyten. Die Darstellung der intrazellulären Verteilung der Fluoreszenz von Indikator **11** (A, 1.00 µM Beladungskonzentration, HBSS, 37 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$) und von Rhodamin 123 (B, 1.00 µM Beladungskonzentration, HBSS, 37 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 - 530 \text{ nm}$) erfolgte 120 Minuten nach Zugabe von 2.00 mM PIH mittels Laser-Scanning-Mikroskopie. (C) Überlagerung der Abbildungen (A) und (B).

^R Für PIH wurde im Vergleich zu anderen Eisenchelatoren wie 2,2'-Dipyridyl oder 1,10-Phenanthrolin die effektivste intramitochondriale Entquenchung, d.h. eine schnellere und vollständigere Regeneration der Indikatorfluoreszenz nach Zugabe des Entquenchers beobachtet. PIH ist ausreichend membranpermeabel, nicht toxisch, besitzt eine Bruttokomplexbildungskonstante von $\log \beta_2 (\text{Fe}^{\text{III}}\text{L}_2^-) = 34.0$ (pH = 7.4) [90] und wurde für alle nachfolgenden Messungen als Entquencher eingesetzt.

Auch bei Variation der Beladungskonzentrationen von **11** und **17** im Bereich von 0.20 - 1.00 μM (20minütige Inkubation bei 37 °C in *Hanks' balanced salt solution*/ HBSS sowie 10minütige, indikatorfreie Nachinkubation) blieb die selektive intramitochondriale Lokalisation der Indikatoren in kultivierten Rattenhepatozyten erhalten.

Die simultane Erfassung der Fluoreszenzintensitäten der Indikatoren **11** und **17** und Rhodamin 123 ermöglichte ferner die Kontrolle des mitochondrialen Membranpotentials (und damit indirekt auch der Zellvitalität) nach Indikatorzugabe.^[130] Ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials würde in einer Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes aus diesen Zellorganellen in das Cytosol und auch in die extrazelluläre Umgebung und damit in einer Verringerung der intramitochondrialen Fluoreszenzintensität resultieren. Um diesen Membranpotential-abhängigen Fluoreszenzabfall nicht irrtümlich auf eine Erhöhung des mitochondrialen chelatisierbaren Eisenpools zurückzuführen, muss die Aufrechterhaltung des Membranpotentials kontrolliert werden.^S Bis zu vier Stunden nach simultaner Beladung kultivierter Rattenhepatozyten mit Indikator **11** oder **17** und Rhodamin 123 wurde jedoch für keinen der beiden potentiellen Indikatoren eine Störung des Membranpotentials und damit Anzeichen für eine Indikator-induzierte Schädigung der Mitochondrien bzw. der Zelle beobachtet.

Die intrazelluläre Verteilung der potentiellen Indikatoren **11** und **17** wurde des weiteren in kultivierten Rattenleberendothelzellen untersucht. In diesem Fall konnte lediglich bei geringen Beladungskonzentrationen eine selektiv intramitochondriale Akkumulation der Indikatoren sichergestellt werden; im Falle von Indikator **17** wurde bereits bei einer Beladungskonzentration von 0.20 μM auch eine deutliche Anfärbung des Cytosols beobachtet (Abbildung 22), die für höhere Beladungskonzentrationen noch zunahm. Aufgrund dieses Befundes sollte die optimale Beladungskonzentration und die Selektivität der Beladung bei Einsatz der Indikatoren in jedem erstmalig eingesetzten Zelltyp neu bestimmt werden.

^S In allen quantitativen Messungen wurde die Zellvitalität jedoch nicht durch Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials sondern mittels Propidiumiodid-Zugabe (siehe 11.12) geprüft, um einen eventuell störenden Einfluss von Rhodamin 123 auf den Eisenpool auszuschließen.

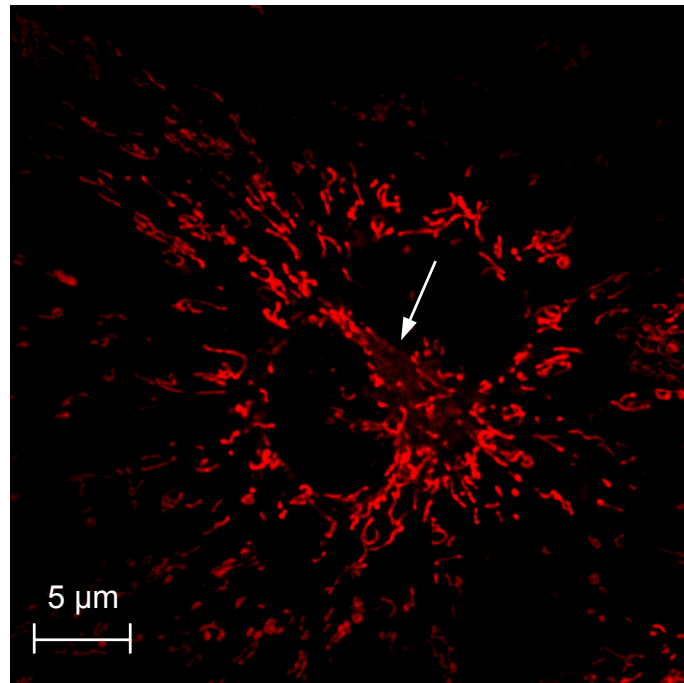


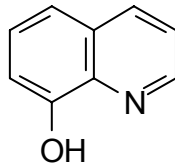
Abbildung 22: Teilweise extramitochondriale Lokalisation von Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) in kultivierten Rattenleberendothelzellen. Bei einer Beladungskonzentration von $1.00 \mu\text{M}$ Indikator **17** in HBSS bei 37°C ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$) ist dessen Präsenz nicht auf die Mitochondrien beschränkt sondern wird bereits teilweise im Cytosol sichtbar.

6.2 Detektion intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens

Die Indikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) reagierten in vitalen Rattenhepatozyten sowohl auf eine Erniedrigung als auch auf eine Erhöhung der Konzentration des verfügbaren intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens.

Wurde diesen Zellen nach einer Beladung mit **11** oder **17** ein nicht-fluoreszierender, lipophiler Eisenchelator mit großer Affinität zu Eisenionen, wie z. B. Pyridoxalisonicotinoylhydrazon (PIH), in großem Überschuss angeboten, stieg die Indikatorfluoreszenz infolge der Umverteilung des chelatisierbaren Eisens vom Indikator zum zugesetzten Chelator innerhalb von etwa vier Stunden stark an; die partielle Fluoreszenzlöschung des Fluoreszenzindikators durch intramitochondriales chelatisierbares Eisen wurde aufgehoben (Abbildungen 23A und B). Wurde hingegen

durch die Zugabe des membranpermeablen Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin-Komplexes^T der mitochondriale chelatisierbare Eisenpool experimentell erhöht, nahm die Indikatorfluoreszenz innerhalb von ein bis drei Minuten stark ab (Abbildungen 23C und D). Der eisenfreie Ligand 8-Hydroxychinolin hatte keinerlei Einfluss auf die Indikatorfluoreszenz.



8-Hydroxychinolin

^T Fe^{3+} -Ionen und 8-Hydroxychinolin wurden in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 2 eingesetzt. Untersuchungen von Lehnen-Beyel et al. bestätigten eine schnelle intrazelluläre Reduktion der Fe^{3+} -Ionen zu Fe^{2+} . [131]

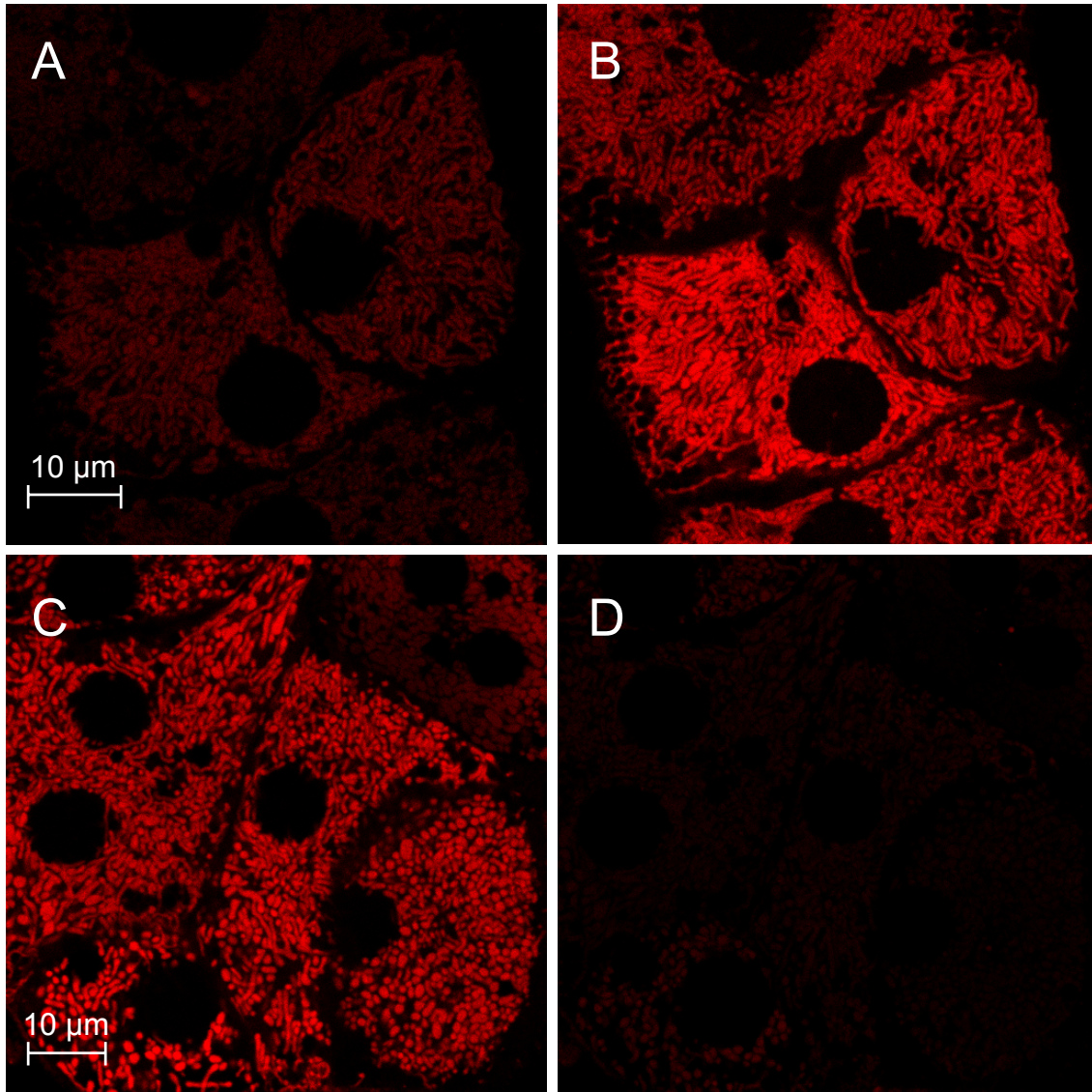


Abbildung 23: Intrazelluläre Fluoreszenz von Indikator **11** (Beladungskonzentration 1.00 µM, HBSS, 37 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$) nach Erhöhung bzw. Erniedrigung der Konzentration intramitochondrial verfügbaren chelatisierbaren Eisens in kultivierten Rattenhepatozyten. (A) vor und (B) 3.5 h nach Zugabe von PIH (2.00 mM) bzw. (C) vor und (D) 2 min nach Zugabe des Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin-Komplexes (10.0 µM). (Die Ausgangsfluoreszenzen in A und C wurden durch verschiedene Geräteeinstellungen jeweils so gewählt, dass die eintretende Änderung der Fluoreszenzintensität deutlich sichtbar wurde aber dennoch innerhalb des linearen Detektorbereiches stattfand. Die Scanning-Parameter sowohl für A und B als auch für C und D sind jedoch identisch.)

6.3 Intramitochondriale Konzentration chelatisierbaren Eisens

In den vorausgegangenen Kapiteln wurden die methodischen Voraussetzungen zur fluoreszenzmikroskopischen Quantifizierung chelatisierbaren Eisens in Mitochondrien vitaler Zellen erläutert. Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) erfüllten alle Bedingungen, die für Fluoreszenzindikatoren zur Untersuchung mitochondrialen chelatisierbaren Eisens obligatorisch sind. Die Indikatoren wurden nunmehr vergleichend zur quantitativen Bestimmung der Konzentration intramitochondrialer chelatisierbarer Fe^{2+} -Ionen in kultivierten Rattenhepatozyten eingesetzt.

Liegen die Indikatoren im Vergleich zur Eisenkonzentration im Überschuss - also zum Teil noch frei und damit sichtbar fluoreszierend - in den Mitochondrien vor, ist die Voraussetzung zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens geschaffen. Die dazu erforderliche intramitochondriale Konzentration des jeweiligen Indikators wurde durch eine Beladung der Zellen mit $0.20\ \mu\text{M}$ Indikator in HBSS über einen Zeitraum von 20 Minuten bei einer Temperatur von $37\ ^\circ\text{C}$ sichergestellt.^U Da die Differenz der Indikatorfluoreszenz vor und nach vollständiger Entquenchung direkt proportional zur intramitochondrialen Konzentration des chelatisierbaren Eisens ist, konnte die Konzentration dieses Eisenpools aus dem Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe des nicht-fluoreszierenden Chelators PIH ($2.00\ \text{mM}$) mit Hilfe der *ex situ*-Kalibrierungen bestimmt werden. Der mittlere intramitochondriale Fluoreszenzanstieg in den Zellen des Bildausschnittes wurde jeweils um den Wert der Hintergrundfluoreszenz korrigiert, mit Hilfe der Kalibrierung in die korrespondierende Indikatorkonzentration umgerechnet und das so erhaltene Ergebnis - begründet durch die 3 : 1-Stöchiometrie - durch drei dividiert. Propidiumiodid-positive^V Zellen wurden in der Auswertung der Versuchsergebnisse nicht berücksichtigt. Der zelluläre Fluoreszenzanstieg

^U Obwohl davon ausgegangen wird, dass der Indikator/ Fe^{2+} -Komplex die innere Mitochondrienmembran nicht passieren kann, wurde der zur Beladung eingesetzten Indikatorlösung in HBSS stets Diethylenetriaminpentaessigsäure (DTPA, $10.0\ \mu\text{M}$) als starker, extrazellulärer Fe^{3+} -Chelator zugesetzt, um ein eventuelles „Einschleppen“ von Eisenionen aus dem Beladungspuffer in die mitochondriale Matrix auszuschließen. Die mitochondriale Innenmembran ist nachweislich nicht permeabel für den DTPA/ Fe^{3+} -Komplex.[13]

^V Propidiumiodid diffundiert nach Verlust der Plasmamembranintegrität in die Zelle und interkaliert dort in die DNA. Die resultierende rote Fluoreszenz des Zellkerns kennzeichnet den Verlust der Zellvitalität.

ist in Abbildung 24 beispielhaft für Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)amino-carbonyl]benzylester (**11**) für einen Versuch dargestellt.

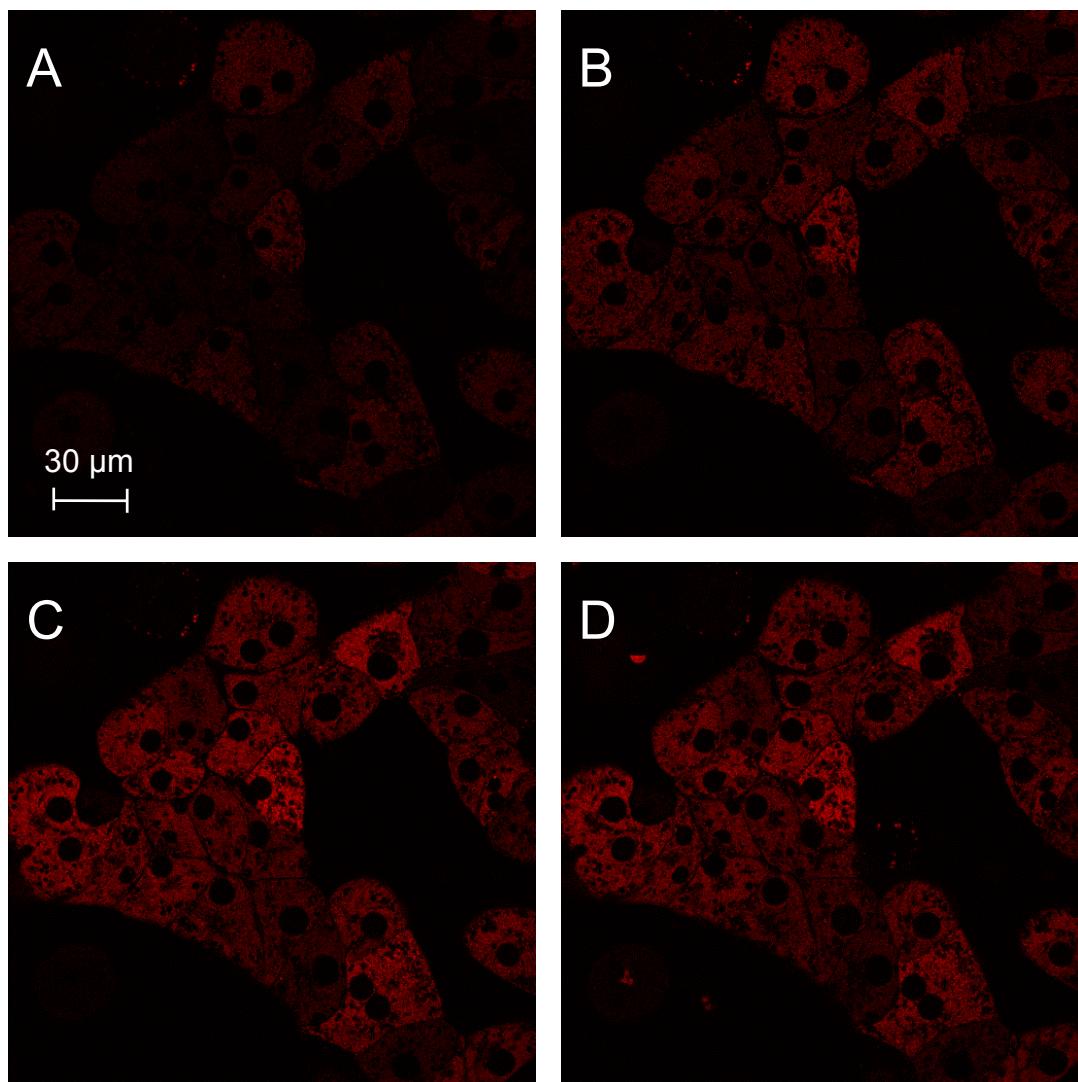


Abbildung 24: Zeitabhängige Erhöhung der intrazellulären Fluoreszenzintensität von Indikator **11** in kultivierten Rattenhepatozyten nach PIH-Zugabe (A - C) und nach Markierung geschädigter Zellen durch Propidiumiodid nach vollständiger Entquenchung (D). Intrazelluläre Fluoreszenz von **11** ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$) (A) nach 20 min Beladung ($0.20 \mu\text{M}$, HBSS, 37°C) und 10 min Nachinkubation (HBSS, 37°C), (B) 1 h nach Zugabe von 2.00 mM PIH, (C) 3 h nach PIH-Zugabe und (D) 2 min nach Zugabe von $5.00 \mu\text{g/mL}$ Propidiumiodid.

Der Zeitverlauf des Fluoreszenzanstiegs ist in Abbildung 25A aufgetragen. Mit Hilfe der unter identischen Geräteeinstellungen durchgeführten Kalibrierung (Abbildung 25B) wurde anhand der Differenz der Fluoreszenzintensität die Konzentration chelatisierbaren Eisens berechnet.

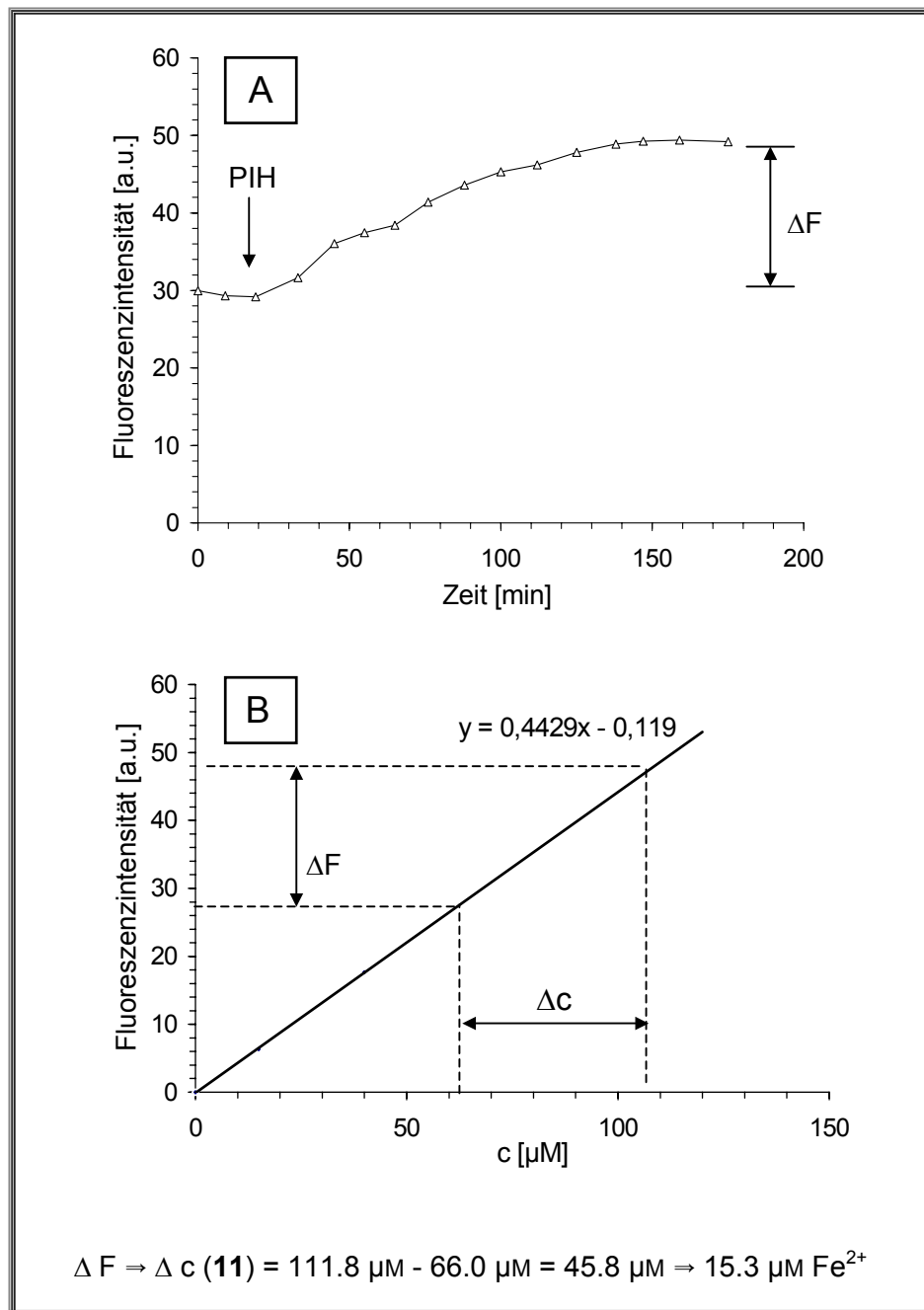


Abbildung 25: Quantitative Bestimmung des hepatozellulären, intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens unter Verwendung von Indikator **11**. (A) Beispielhafter Zeitverlauf des Anstiegs der intramitochondrialen Indikatorfluoreszenz nach PIH-Zugabe (2.00 mM), gemessen mittels Laser-Scanning-Mikroskopie (0.20 μM Beladungskonzentration, HBSS, 37 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$), (B) Bestimmung der zugehörigen Indikatorkonzentration und Berechnung der Fe^{2+} -Ionenkonzentration anhand der *ex situ*-Kalibrierung.

Entsprechend des vorgenannten Messprotokolls wurden an drei verschiedenen Messtagen und damit für drei verschiedene Zellpräparationen (drei unterschiedliche Tiere) die in Tabelle 6 aufgeführten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 6: Mittlere intramitochondriale Konzentration von chelatisierbarem Eisen und mittlere intrazelluläre Konzentrationen der Indikatoren **11** und **17** in kultivierten Rattenhepatozyten

Indikator	Fe ²⁺ -Ionenkonzentration [µM]				
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Mittelwert	Standard-abweichung
11	14.6	15.3	18.1	16.0	1.9
17	15.9	17.5	17.1	17.0	1.0
Intrazelluläre Indikatorkonzentration [µM]					
11	71.4	111.8	82.4	88.5	20.9
17	103.5	113.7	100.6	105.9	6.9

In Mitochondrien vitaler Rattenhepatozyten wurde so unter Verwendung von Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) eine mittlere Konzentration von $16.0 \pm 1.9 \mu\text{M}$ chelatisierbaren Eisens bei einer mittleren intrazellulären Indikatorkonzentration von $88.5 \pm 20.9 \mu\text{M}$ detektiert. Bei Verwendung von Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) wurde ein Wert von $17.0 \pm 1.0 \mu\text{M Fe}^{2+}$ bei einer mittleren Indikatorkonzentration von $105.9 \pm 6.9 \mu\text{M}$ gefunden. Individuelle Mitochondrien derselben Zelle wiesen dabei deutlich unterschiedliche Eisenkonzentrationen auf, die vermutlich auf eine uneinheitliche Eisenhomöostase dieser Mitochondrien zurückzuführen sind.^[132] Die Konzentration mitochondrialen Eisens ist damit im Hepatozyten deutlich höher als die cytosolische Konzentration chelatisierbaren Eisens,^[13] ein Befund, der gerade im Hinblick auf die Rolle der Mitochondrien als Hauptquelle von Superoxidanionradikalen und Wasserstoffperoxid von erheblicher Bedeutung sein kann.

Die Auftragung der berechneten Konzentrationen intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens gegen die jeweils vorliegende intrazelluläre Indikatorkonzentration spricht nicht für eine Abhängigkeit der gefundenen Fe²⁺-Konzentration von der Indikatorbeladung (Abbildung 26).

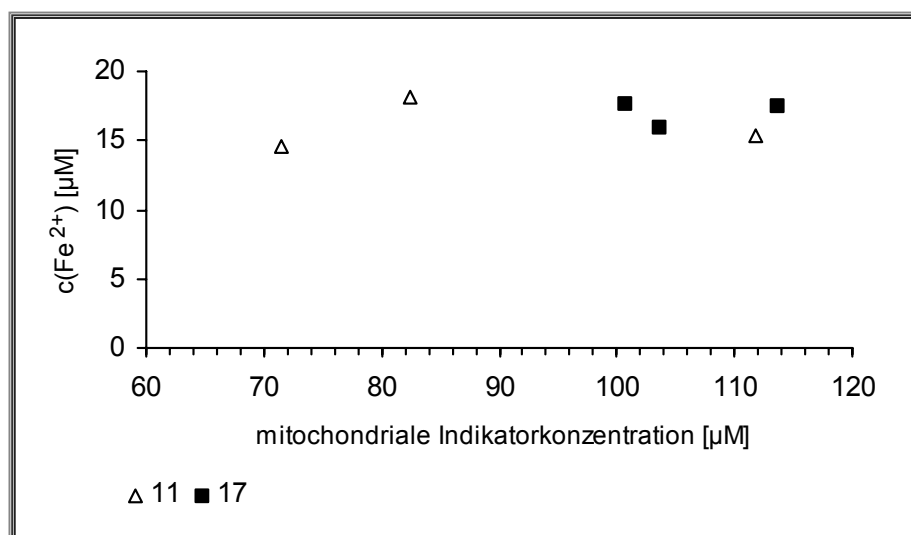


Abbildung 26: Auftragung der gemessenen intramitochondrialen Fe^{2+} -Ionenkonzentration gegen die intrazelluläre Konzentration der Indikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**).

Im Rahmen der Fehlergrenzen wurden für die Indikatoren **11** und **17** vergleichbare Werte chelatisierbaren Eisens gefunden. Dieses befriedigende Ergebnis bestätigt die bereits in Untersuchungen im zellfreien System ausgeschlossene Konkurrenz der beiden Fluoreszenzsonden mit zelleigenen, niedermolekularen Liganden um das mitochondriale chelatisierbare Eisen. Das übereinstimmende Ergebnis charakterisiert die gefundene Eisenkonzentration überdies anschaulich als nicht-proteingebundenes Eisen.

Neben den genannten unerlässlichen Indikatoreigenschaften zur Eisen-Quantifizierung konnte durch den Einsatz im zellulären System für die Indikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) außerdem eine gute Photostabilität sowie eine sehr geringe Cytotoxizität festgestellt werden.

7 ANWENDUNG IN PATHOBIOCHEMISCHEN FRAGESTELLUNGEN

Die Fluoreszenzindikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) konnten erfolgreich zum Nachweis chelatisierbaren Eisens in Mitochondrien unter physiologischen Bedingungen eingesetzt werden. In den folgenden Kapiteln soll nun die Anwendungsmöglichkeit der Indikatoren in pathobiochemischen Fragestellungen untersucht werden. Konkret ist die Rolle des mitochondrialen chelatisierbaren Eisens beim kälteinduzierten Zellschädigungsprozess aufzuklären.

In Versuchen an kultivierten Rattenhepatozyten wurde gezeigt, dass unter den Bedingungen der in der Transplantationsmedizin üblichen Organkonservierung durch Kaltlagerung (Hypothermie) eine erhebliche Zellschädigung auftritt, die sowohl durch Hydroxylradikal-Fänger als auch durch Eisenchelatoren inhibiert werden kann.^[39, 40]

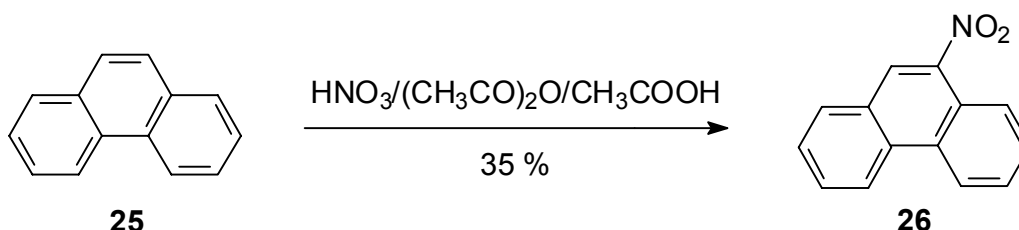
Für diesen Zelltyp wurde ferner nachgewiesen, dass eine experimentell - durch die Zugabe von Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin - erhöhte Konzentration von intrazellulärem chelatisierbaren Eisen eine Zellschädigung hervorruft, die den programmierten Zelltod (Apoptose) zur Folge hat, und dass auch die kälteinduzierte Apoptose auf einen Konzentrationsanstieg des hepatozellulären chelatisierbaren Eisens zurückgeführt werden kann.^[40] Eine Spezifikation des ursächlichen Eisenpools bzw. die Untersuchung eines Anstiegs der Konzentration des mitochondrialen chelatisierbaren Eisens war jedoch mit den derzeit verfügbaren Methoden nicht möglich. In diesem Zusammenhang war festzustellen, ob eine Temperaturerniedrigung auf 4 °C möglicherweise einen Einfluss auf die bereits unter physiologischen Bedingungen relativ hohe Konzentration mitochondrialen chelatisierbaren Eisens hat.

Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit von Pyridoxalisonicotinoylhydrazon (PIH) bei 4 °C sowie aufgrund eines mangelnden Ersatzes schied jedoch die Verwendung eines Entquencher, wie das im mitochondrialen Einsatz bewährte PIH, aus. Damit war eine quantitative Bestimmung des intramitochondrialen chelatisierbaren Eisenpools bei 4 °C nicht realisierbar. Daraus entwickelte sich die Vorstellung, eine bei Temperaturerniedrigung im zellulären System unter Umständen auftretende Änderung der Fluoreszenzintensität von Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) mit dem Fluoreszenzverhalten eines Eisen-insensitiven „Referenzfarbstoffes“ unter analogen Bedingungen zu vergleichen und

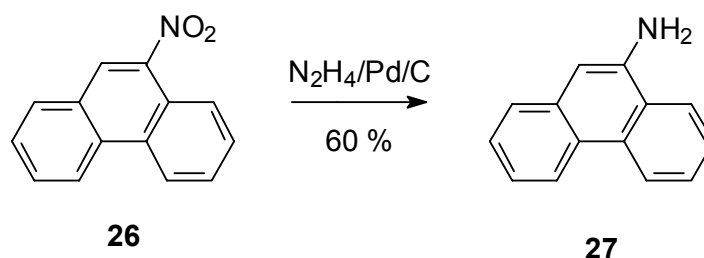
so qualitativ abzuschätzen, ob eine Temperaturerniedrigung von 37 °C auf 4 °C eine Veränderung des genannten Eisenpools auslöst. Die neu zu synthetisierende Referenzsubstanz soll, abgesehen von der fehlenden Ligandeneinheit für Eisenionen, in Struktur und den damit verbundenen Eigenschaften wie Lipophilie und Membrangängigkeit dem Fluoreszenzindikator **11** weitgehend entsprechen. Die Substitution von 1,10-Phenanthrolin (**1**) durch Phenanthren (**25**) erschien im Hinblick auf die Durchführbarkeit der Synthese des Referenzfarbstoffes besonders geeignet.

7.1 Synthese eines „Referenzfarbstoffes“

Durch Nitrierung von Phenanthren (**25**) mit Hilfe eines Gemisches von Salpetersäure und Essigsäureanhydrid wurden alle fünf möglichen Mononitrophenanthren-Isomere erhalten. Durch Säulenchromatographie und Umkristallisation konnte daraus das erwünschte 9-Nitrophenanthren (**26**) isoliert werden.^[133]

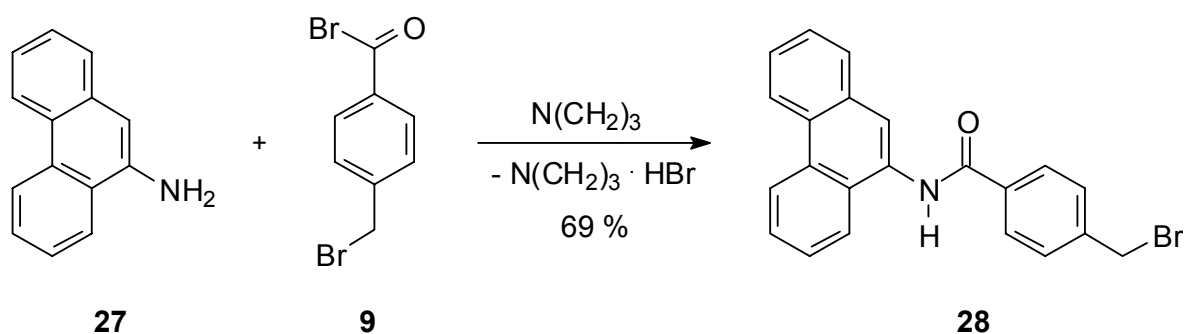


9-Phenanthrylamin (**27**) wurde wiederum durch Palladium-katalysierte Reduktion des Nitro-Derivates **26** unter Verwendung von Hydrazin als Wasserstofflieferant erhalten.^[134]

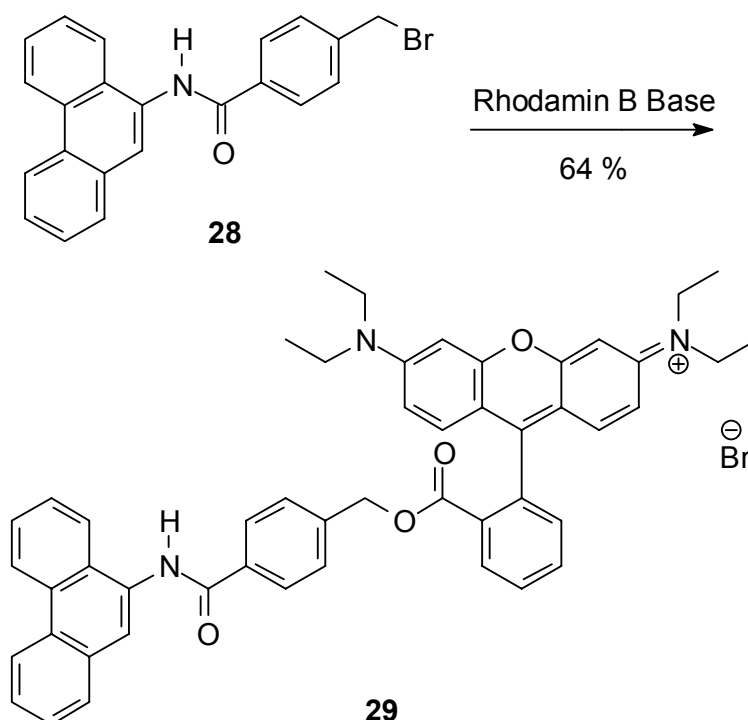


Zur Darstellung von 4-(Brommethyl)-*N*-9-phenanthrylbenzamid (**28**) wurden 9-Phenanthryl-amin (**27**) und das Säurehalogenid **9** in Anwesenheit von Triethylamin

zur Reaktion gebracht. Das Amid **28** wurde durch Aufarbeitung des Filtrats gewonnen.



Durch die nachfolgende Kupplungsreaktion von Amid **28** und Rhodamin B Base wurde Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) erhalten. Die Isolierung des Fluoreszenzfarbstoffes **29** gelang auch in diesem Fall durch säulenchromatographische Trennung.



Die Charakterisierung von Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) erfolgte mit Hilfe der üblichen Analysemethoden. Auch für den Referenzfarbstoff **29** gelten die bereits für die Indikatoren **11** und **17** erwähnten Aufbewahrungsvorschriften.

7.2 Untersuchung der Referenzsubstanz im zellfreien System

Die Eignung von Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) als Referenzsubstanz für Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) wurde zunächst im zellfreien System untersucht.

Auch das Absorptions- und das Emissionsspektrum von **29** in Tris/HCl-gepufferter, wässriger Lösung (pH = 8.2) entsprechen in Lage und Form den Spektren des freien Fluorophors Rhodamin B (Abbildung 27). Das Fluoreszenzverhalten ändert sich nach Zugabe einer wässrigen Eisen(II)ammoniumsulfat/Trinatriumcitrat-Lösung nicht. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzindikatoren **11** und **17** wird demnach die Fluoreszenz von **29** durch Fe^{2+} -Ionen erwartungsgemäß nicht gelöscht.

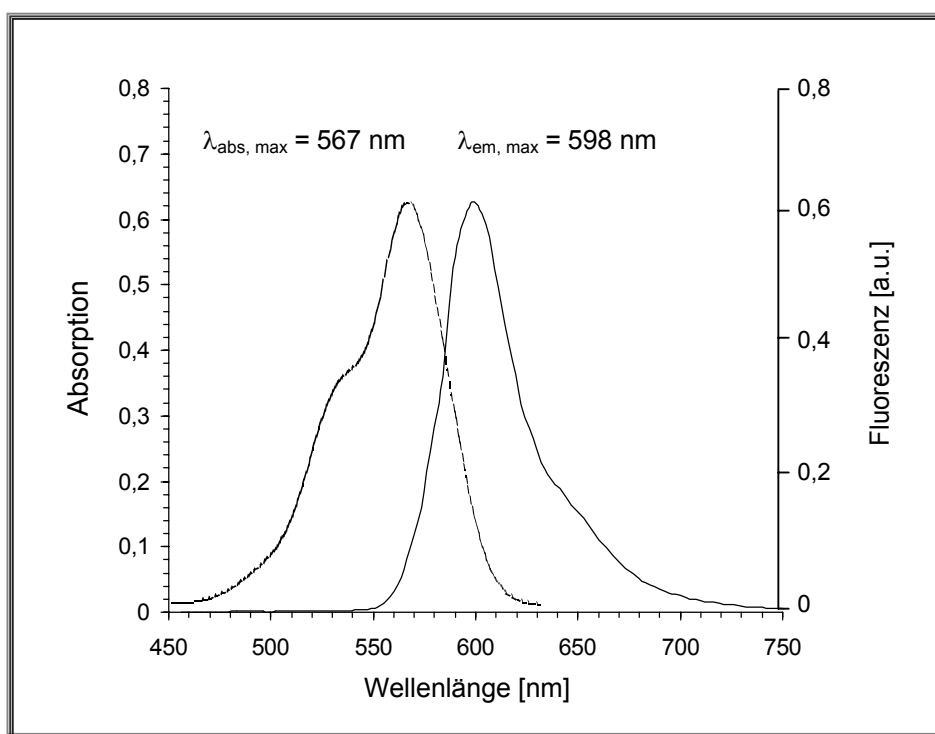


Abbildung 27: Absorptions- (---) und Emissionsspektrum (—) des Referenzfarbstoffes **29** (10.0 μM Farbstoffkonzentration, 10.0 mM Tris/HCl, 0.18 % w/v SDS, pH = 8.2, 22 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 567 \text{ nm}$).

Um die intramitochondriale Konzentration des Referenzfarbstoffes **29** in späteren zellulären Anwendungen ermitteln zu können, wurde auch für **29** zunächst eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Farbstoffkonzentration sichergestellt. Die erforderlichen Fluoreszenzmessungen wurden in einfachem, gepuffertem Medium (Tris/HCl, 0.18 % w/v SDS, pH = 8.2) sowie in „mitochon-

drialem“ Medium bei einer Temperatur von 37 °C mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt.

In Abbildung 28 sind neben der geforderten linearen Abhängigkeit für Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) vergleichend die Fluoreszenzintensitäten von Indikator **11** und dessen Eisen-insensitiver Referenz **29** im chemischen System (Tris/HCl, 0.18 % w/v SDS, pH = 8.2) unter analogen Bedingungen jedoch für zwei unterschiedliche Temperaturen (37 und 4 °C) in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration aufgetragen. Beide Fluoreszenzfarbstoffe zeigen bei einer Temperatur von 37 °C eine geringere Fluoreszenzintensität als bei 4 °C.

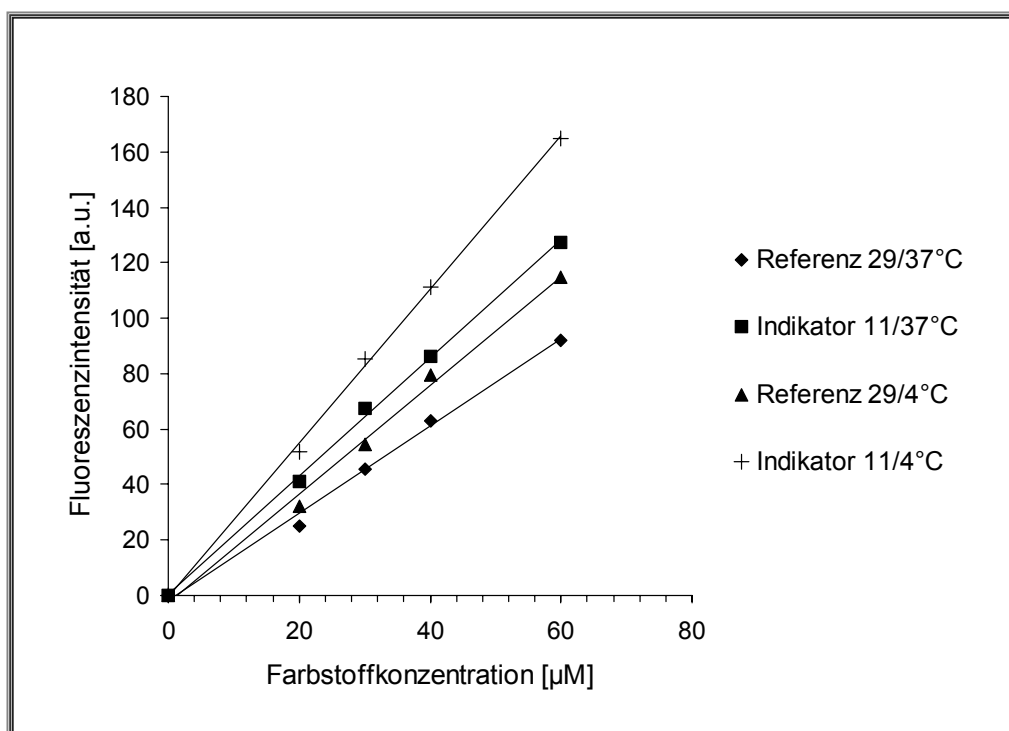


Abbildung 28: Fluoreszenzintensität von Indikator **11** und Referenzfarbstoff **29** in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration bei Temperaturen von 37 °C und 4 °C im zellfreien System (10.0 mM Tris/HCl, 0.18 % w/v SDS, pH = 8.2).

Ursächlich für den Fluoreszenzanstieg bei Temperaturerniedrigung ist die reduzierte Geschwindigkeit des strahlungslosen Übergangs (*internal conversion*) in den niedrigsten elektronisch angeregten Zustand. Eine erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute bei Temperaturerniedrigung entsprechend Gleichung 15 ist die Folge.^[126, 135]

$$\Phi_F = \frac{k_{FM}}{k_{FM} + \bar{K} + k_t e^{(-\Delta E_A / k_B T)}}, \quad (15)$$

wobei k_{FM} die Geschwindigkeitskonstante des Fluoreszenzübergangs, \bar{K} die Summe der Geschwindigkeitskonstanten der temperaturunabhängigen und k_t die Geschwindigkeitskonstante der temperaturabhängigen (strahlungslosen) Deaktivierungsprozesse, E_A die Aktivierungsenergie und k_B die Boltzmann-Konstante darstellt.

7.3 Untersuchung der Referenzsubstanz im zellulären System

In Colokalisationsuntersuchungen mit dem Mitochondrienmarker Rhodamin 123 wurde für den Referenzfarbstoff **29** ebenso wie für die Indikatoren **11** und **17** eine spezifisch intramitochondriale Lokalisation bei Beladungskonzentrationen im Bereich von 0.20 - 1.00 μM (20 min, 37 °C, HBSS, 10 min indikatorfreie Nachinkubation) beobachtet. Durch die simultane Erfassung der Fluoreszenzintensität von Rhodamin 123 konnte außerdem eine schädigende Wirkung des Referenzfarbstoffes **29** ausgeschlossen werden.

Der Fluoreszenzfarbstoff **29** reagierte in vitalen Rattenhepatozyten weder auf eine Erniedrigung noch auch auf eine Erhöhung (Abbildung 29) der Konzentration der intramitochondrial verfügbaren chelatisierbaren Eisen-Ionen, die auch hier zum einen durch eine PIH-Zugabe und zum anderen durch Zugabe des Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin-Komplexes erreicht wurde.

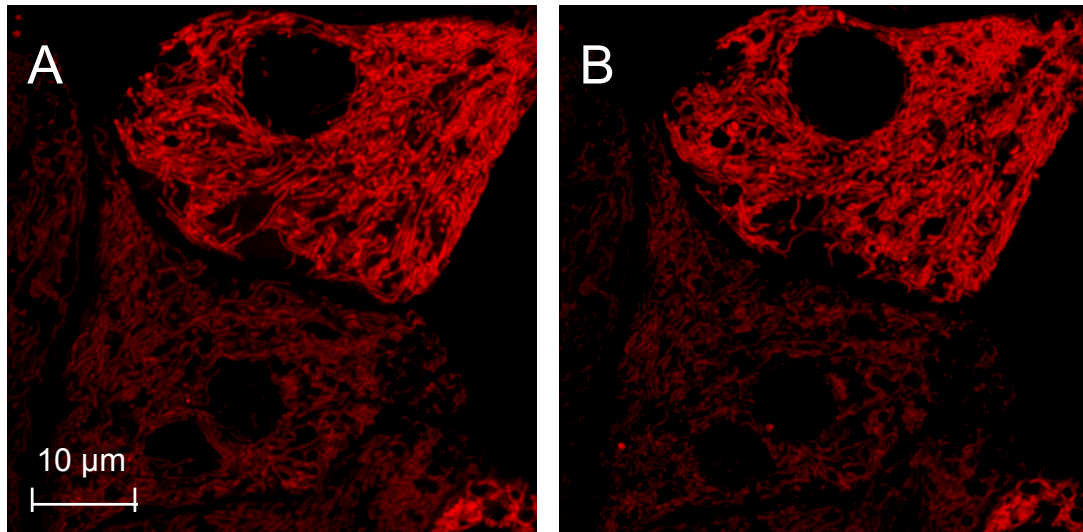


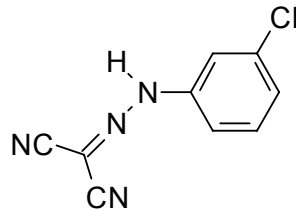
Abbildung 29: Bei Erhöhung der intramitochondrialen Konzentration chelatisierbaren Eisens in kultivierten Rattenhepatozyten bleibt die intramitochondriale Fluoreszenz von Referenzfarbstoff **29** unbeeinflusst. Intrazelluläre Fluoreszenz von **29** (Beladungskonzentration 1.00 µM, HBSS, $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$) (A) vor und (B) 2 min nach Zugabe des Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin-Komplexes (10.0 µM). (Die Geräteeinstellungen sind für A und B identisch.)

Um ein übereinstimmendes Verhalten (Auslecken) der Fluoreszenzfarbstoffe **11** und **29** bei einer Zellschädigung sicherzustellen, wurde das Membranpotential der Mitochondrien kultivierter Rattenhepatozyten durch Zugabe sogenannter Entkoppler^w aufgehoben. Die Aufhebung des mitochondrialen Membranpotentials führt dabei zu einer Freisetzung des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes aus den Mitochondrien in das Cytosol und die extrazelluläre Umgebung und es resultiert ein Abfall der intramitochondrialen Fluoreszenzintensität.

So wurde am digitalen Attofluor-System nach Zugabe des Entkopplers 3-Chlor-carbonylcyanidphenylhydrazon (CCCP) zu mit Fluoreszenzfarbstoff **11** oder **29** beladenen, vitalen Rattenhepatozyten der zeitliche Verlauf des intramitochondrialen Fluoreszenzintensitätsabfalls bei einer Temperatur von 37 °C verfolgt (Abbildungen

^w Entkoppler sind generell lipophile und damit gut membrangängige organische Verbindungen, die leicht protoniert bzw. deprotoniert werden können. Aufgrund dieser Eigenschaften können sie die durch die Multienzymkomplexe der Atmungskette auf die Außenseite der inneren Mitochondrienmembran transportierten Protonen binden und entlang des Konzentrationsgradienten wieder in den Matrixraum der Mitochondrien zurücktransportieren. Dies führt neben dem Zusammenbruch des über der inneren Mitochondrienmembran aufgebauten elektrochemischen Potentials trotz funktionierendem Elektronentransport auch zu einem Verlust der protonengetriebenen ATP-Bildung durch oxidative Phosphorylierung.[136]

30A und B). Die intramitochondriale Fluoreszenzintensität bzw. die intramitochondriale Konzentration von **11** und **29** nahm nach Entkopplung durch CCCP gleichermaßen schnell ab.



3-Chlorcarbonylcyanidphenylhydrazon

Abbildung 30 ist ferner eine gegenüber dem Indikator **11** deutlich erhöhte Ausgangsfluoreszenz des Referenzfarbstoffes **29** zu entnehmen, die auf der lediglich für den Indikator **11** aber nicht für Referenz **29** existierenden Eisen-induzierten Fluoreszenzlöschung basiert.

Auch die Untersuchung des Fluoreszenzfarbstoffes **29** im zellulären System bestätigte damit dessen Eignung als Eisen-insensitive Referenz zum Fluoreszenz-indikator **11**.

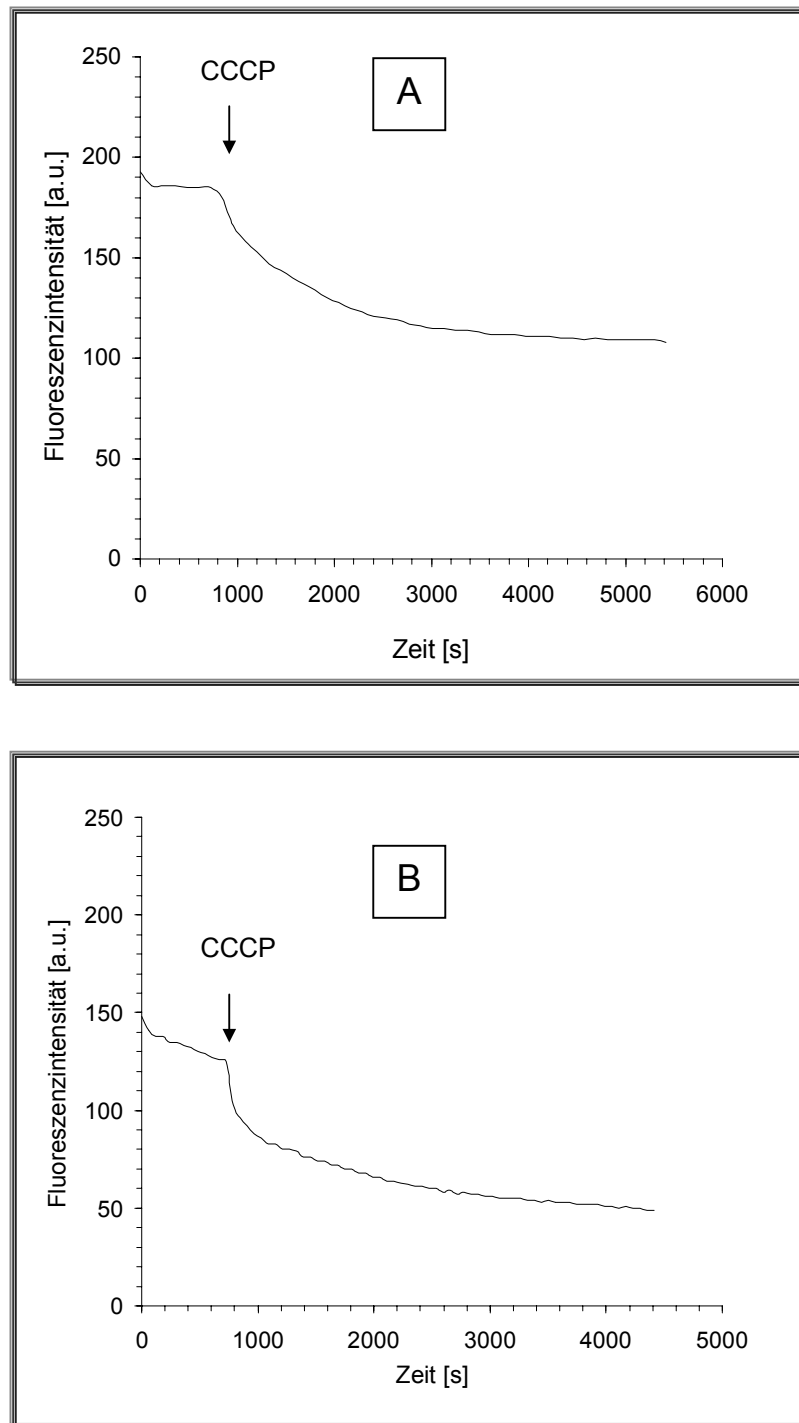


Abbildung 30: Zeitabhängige Abnahme der intramitochondrialen Fluoreszenzintensität nach Zugabe des Entkopplers CCCP ($10.0 \mu\text{M}$) von Indikator **11** und Referenzfarbstoff **29** in kultivierten Rattenhepatozyten. Freisetzung (A) von **29** und (B) von **11** aus Mitochondrien (Beladungskonzentration jeweils $0.50 \mu\text{M}$, HBSS, 37°C , Messung mittels digitaler Fluoreszenzmikroskopie, Messintervalle 120 s , $\lambda_{\text{exc}} = 535 \pm 17 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 590 \text{ nm}$).

7.4 Die Rolle mitochondrialen chelatisierbaren Eisens beim kälteinduzierten Zellschädigungsprozess

Erst kürzlich wurde von Rauen *et al.*^[40] in Hepatozyten ein kälteinduzierter Anstieg der Konzentration des gesamtzellulären chelatisierbaren Eisens nachgewiesen. In diesen Messungen konnte jedoch aufgrund fehlender mitochondrienspezifischer Eisenindikatoren ausschließlich cytosolisches bzw. nukleäres chelatisierbares Eisen berücksichtigt werden.

In Abbildung 31 ist beispielhaft für die Rattenhepatozyten einer Zellpräparation der Effekt der Kaltinkubation (4 °C) auf das Fluoreszenzverhalten von Indikator **11** und seiner Referenz **29** dargestellt. Nach der Beladung der Zellen mit Indikator **11** bei 37 °C wurde während der Abkühlung auf 4 °C in keinem Fall ein Abfall der Indikatorfluoreszenz beobachtet, der auf eine Erhöhung des intramitochondrialen chelatisierbaren Eisenpools zurückzuführen wäre. Stattdessen wurde ein leichter Fluoreszenzanstieg detektiert, wobei die intramitochondriale Lokalisation für den Großteil der untersuchten Zellen auch bei Kaltinkubation bestehen blieb. Eine parallele Kontrollmessung unter Verwendung des Referenzfarbstoffes **29** zeigte ein identisches Fluoreszenzverhalten. Damit wurde bestätigt, dass die Erhöhung der Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe ausschließlich photophysikalisch begründet ist und eine Veränderung des intramitochondrialen chelatisierbaren Eisenpools als Folge einer Hypothermie ausgeschlossen werden kann.

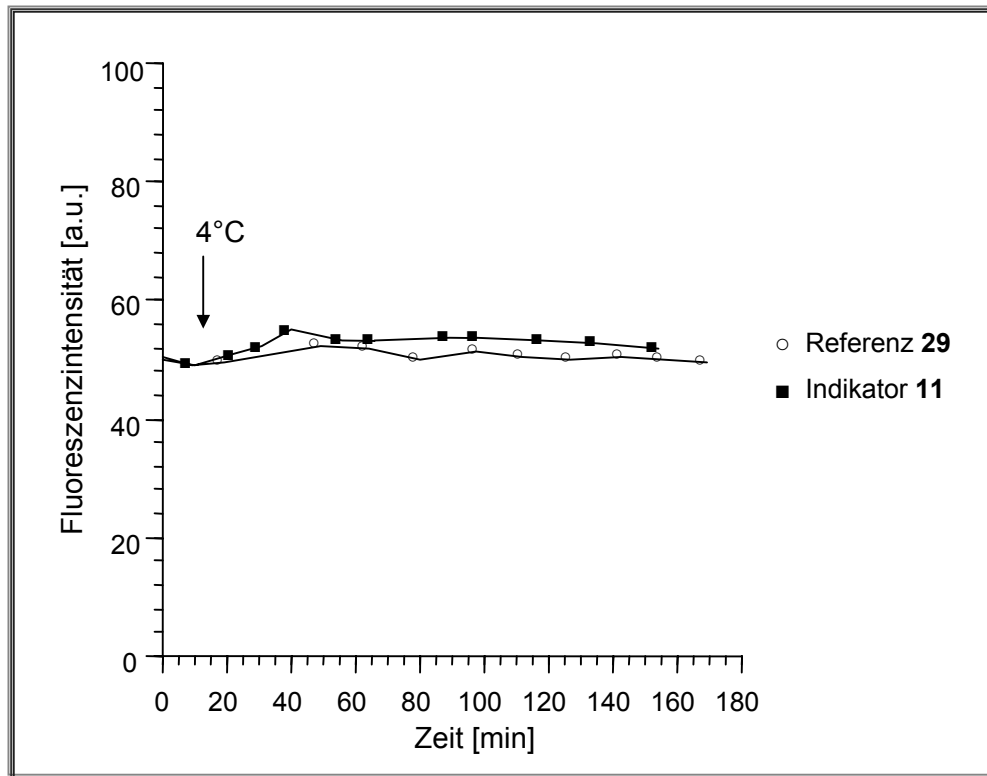


Abbildung 31: Einfluss der Kaltinkubation auf das mitochondriale chelatisierbare Eisen kultivierter Rattenhepatozyten. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität von Indikator **11** und Referenz **29** wurde am Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet (Beladungskonzentration jeweils 0.50 μM , Beladung in HBSS bei 37°C, Messungen in Hydrogencarbonat-freiem L-15 Medium, pH = 7.10/37 °C bzw. pH = 7.35/4 °C, λ_{exc} = 543 nm, λ_{em} \geq 560 nm). 15 Minuten nach Beginn der Messungen wurden die Zellen mittels temperierbarem Mikroskoptisch von 37 °C auf 4 °C heruntergekühlt. Die vergleichbaren Ausgangsfluoreszenzen von **11** und **29** sind bei den gegebenen Geräteeinstellungen durch die nachfolgend in Kapitel 8 bestätigte geringere Fluoreszenzquantenausbeute von **29** begründet. (Die Messungen an Hepatozyten einer Zellpräparation unter Verwendung von **11** und **29** erfolgten unter identischen Geräteeinstellungen und sind repräsentativ für insgesamt drei Messungen mit Zellen unterschiedlicher Tiere.)

8 BESTIMMUNG DER FLUORESZENZQUANTENAUSBEUTEN

Per Definition wird die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F eines photophysikalischen Prozesses angegeben als

$$\Phi_F = \frac{\text{Zahl emittierter Lichtquanten}}{\text{Zahl absorbierter Lichtquanten}}. \quad (15)$$

Sie ist damit ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein absorbiertes Lichtquant wiederum als solches emittiert wird. Die Werte für Φ_F liegen definitionsgemäß zwischen 0 und 1 (bzw. zwischen 0 und 100 %) und werden weitgehend durch die individuelle Molekülstruktur, aber auch durch externe Faktoren wie die Temperatur bestimmt. Die einfachste und daher gängigste Methode zur Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten beruht auf dem relativen Vergleich des Emissionsspektrums eines unbekannten Fluorophors mit dem eines Referenzmoleküls, dessen absolute Quantenausbeute bekannt ist. Unter Verwendung identischer Geräteeinstellungen und bei gleicher Temperatur ist die Quantenausbeute gegeben durch die Gleichung

$$\Phi_u = \left(\frac{A_s F_u n_u^2}{A_u F_s n_s^2} \right) \Phi_s, \quad (16)$$

wobei die Indizes „u“ die unbekannte Substanz und „s“ den Standard beschreiben. A steht für die Absorptionswerte bei der verwendeten Anregungswellenlänge, F für die integrierten Emissionsbereiche und n für die Brechungsindizes des jeweiligen Lösungsmittels. Als weitere Bedingung wird für die unbekannte Substanz und den Standard eine möglichst ähnliche Form des Emissionsspektrums verlangt.^[137]

In unserem Falle wurden die Werte Φ_F der Verbindungen **11**, **17** und **29** in einfachem, gepuffertem Medium (10.0 μM Farbstofflösung in 10.0 mM Tris/HCl, pH = 8.2, 0.18 w/v SDS) unter Verwendung des Standards Rhodamin B (0.50 μM in Ethanol) mit der Fluoreszenzquantenausbeute von 0.73^[84] berechnet. Als Brechungsindizes wurden näherungsweise die Werte der reinen Lösungsmittel (Ethanol: $n_D^{20} = 1.3611$ und Wasser: $n_D^{20} = 1.33336$)^[138] verwendet.

Die berechneten Fluoreszenzquantenausbeuten der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (11),

Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) und Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Fluoreszenzquantenausbeuten der Fluoreszenzfarbstoffe **11**, **17**, und **29** (20 °C)

Farbstoff	Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_u^{\text{a)}$	Standardabweichung
11	0.15	0.02
17	0.17	0.02
29	0.14	0.02

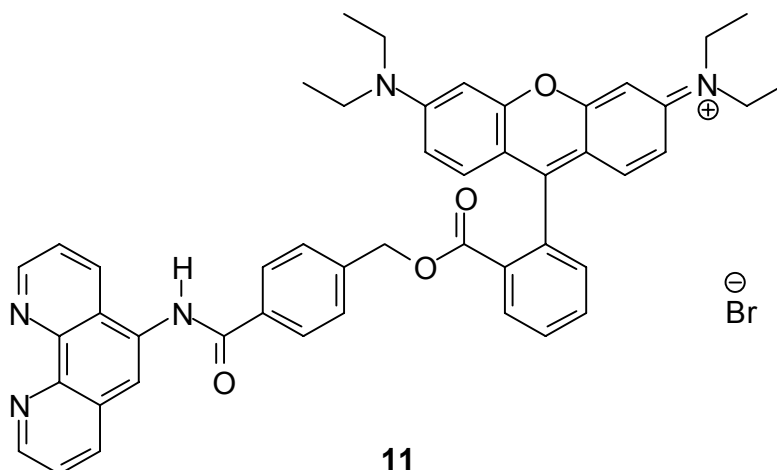
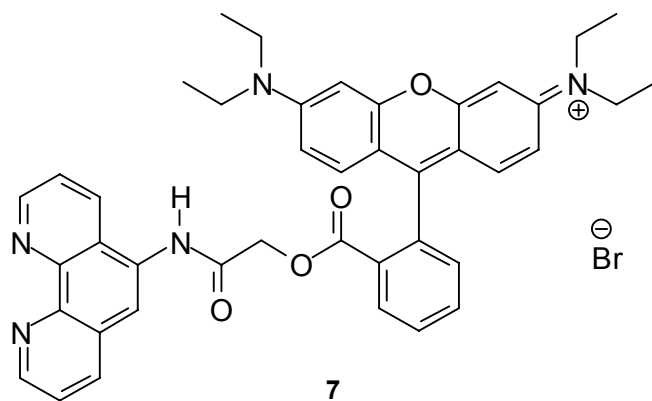
a) Mittelwert aus vier Fluoreszenzintensitätsbestimmungen unter Verwendung von vier unterschiedlichen Anregungswellenlängen

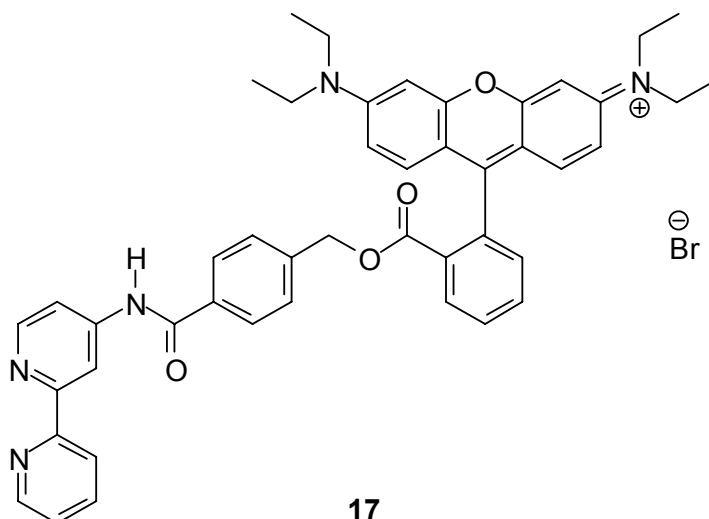
Die Fluoreszenzquantenausbeuten der Indikatoren **11** und **17** bzw. des Referenzfarbstoffes **29** sind - vermutlich bedingt durch die erhöhte Anzahl der Rotations- und Schwingungsfreiheitsgrade und die damit verbundene deutlich schnellere strahlungslose Deaktivierung - geringer als die des reinen Fluorophors Rhodamin B.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Entwicklung und Anwendung von Fluoreszenzsonden zur selektiven Bestimmung des physiologisch und pathophysiologisch sehr bedeutsamen, jedoch aufgrund fehlender Nachweismethoden bislang unzureichend charakterisierten, intramitochondrialen Pools chelatisierbaren Eisens in vitalen Zellen. Als potentielle Fluoreszenzindikatoren zur Charakterisierung dieses Eisenpools wurden die membrangängigen, kationischen Verbindungen Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (**7**), Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) synthetisiert.

In Untersuchungen im zellfreien System konnte zunächst für alle drei Fluoreszenzindikatoren eine vorteilhafte Anregbarkeit im langwelligen Bereich sichergestellt werden, die das Risiko einer photochemischen Zellschädigung während der Fluoreszenzmessungen sowie die Beeinträchtigung der Messungen durch die mitochondriale Eigenfluoreszenz minimiert.





Die im langwelligen Bereich auftretende Fluoreszenz der drei Indikatoren wird durch Fe^{2+} -Ionen gelöscht. Die für 1,10-Phenanthrolin- bzw. 2,2'-Dipyridyl-Derivate zu erwartende konstante Stöchiometrie von 3 : 1 bestand im intramitochondrial maßgeblichen Konzentrationsbereich lediglich für die Fe^{2+} -Komplexe der Indikatoren **11** und **17**. Die durch den Abstandshalter Bromacetylbromid zu begründende variable Bindungsstöchiometrie des Indikator **7**/ Fe^{2+} -Komplexes und die damit verbundene fehlende Kalibrierungsmöglichkeit ließ ausschließlich den qualitativen Nachweis mitochondrialen chelatisierbaren Eisens jedoch keine verlässliche Quantifizierung dieses Eisenpools unter Verwendung von Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]methylester (**7**) zu.

Die Eignung der Fluoreszenzindikatoren **11** und **17** wurde zudem durch die zur *ex situ*-Kalibrierung gleichfalls unerlässliche lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Farbstoffkonzentration bestätigt. Auch der Einfluss möglicher Störfaktoren wurde im zellfreien System untersucht. So wird die Fluoreszenz beider Indikatoren von den im zellulären System relevanten Übergangsmetallkationen neben Fe^{2+} lediglich noch durch Cu^{2+} und (in geringerem Maße) durch Fe^{3+} , Co^{2+} und Ni^{2+} gelöscht. Intrazellulär liegen diese Übergangsmetallionen jedoch in so geringen Konzentrationen vor, dass ihr Einfluss auf die Indikatorfluoreszenz in zellulären Messungen vernachlässigt werden kann. Die Fluoreszenz bzw. die Eisen-induzierte Löschung der Fluoreszenz der Indikatoren **11** und **17** wird des weiteren durch Änderungen biologischer Einflussfaktoren (pH-Wert, Ionenstärke, Viskosität, Osmolarität sowie zelluläre Chelatoren wie Citrat und ATP in für das zelluläre System relevanten Größenordnungen) kaum beeinflusst.

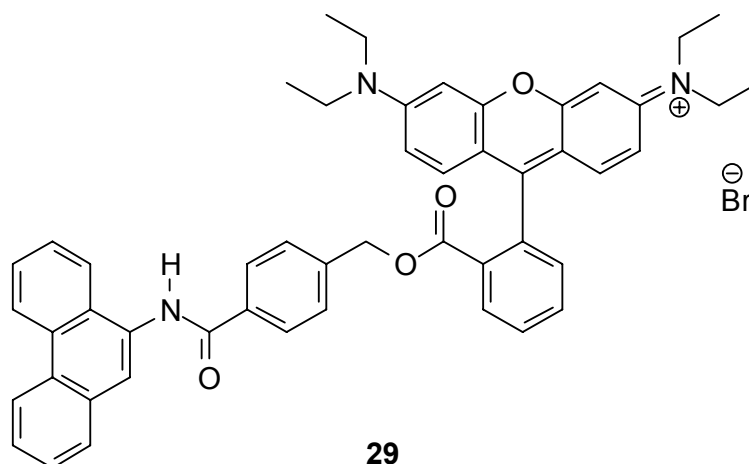
In nachfolgenden Untersuchungen im zellulären System konnte sowohl eine ausgeprägte und selektive Akkumulation der Indikatoren innerhalb der mitochondrialen Matrix als auch eine deutliche Reaktion der Indikatorfluoreszenz auf eine experimentelle Erniedrigung bzw. Erhöhung der Konzentration der verfügbaren intramitochondrialen chelatisierbaren Eisenionen nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung dieses Eisenpools unter physiologischen Bedingungen gelang mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit hoher räumlicher Auflösung und Empfindlichkeit. Das konfokale Bildaufnahmesystem erwies sich vor allem aufgrund der hier anwendbaren *ex situ*-Kalibrierung als sehr vorteilhaft. Nach der Entquenchung durch Zugabe des membrangängigen Eisenchelators Pyridoxalisonicotinoylhydrazon wurde in Mitochondrien kultivierter Rattenhepatozyten unter Verwendung von Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) eine mittlere Konzentration chelatisierbaren Eisens von $16.0 \pm 1.9 \mu\text{M}$ gefunden. Bei Anwendung von Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) wurde eine Konzentration von $17.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$ chelatisierbaren Eisens detektiert. Die im Rahmen der Fehlergrenzen gute Übereinstimmung der gefundenen Eisenkonzentrationen (trotz unterschiedlicher Bruttokomplexbildungskonstanten der entsprechenden Indikator/ Fe^{2+} -Komplexe) schloss somit eine Konkurrenzsituation der Indikatoren mit niedermolekularen zelleigenen Liganden um das mitochondriale chelatisierbare Eisen aus. Diese Tatsache bekräftigte jedoch eine vollständige Erfassung des chelatisierbaren Eisenpools ohne artifizielle Freisetzung von Eisen aus Speicherproteinen.

Die neu entwickelten Indikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) ließen damit erstmals eine spezifische Bestimmung chelatisierbaren Eisens in Organellen vitaler Zellen zu.

Die Anwendung der neu entwickelten Indikatoren für pathobiochemische Fragestellungen erforderte die Synthese einer Eisen-insensitiven Referenzsubstanz. Die Darstellung von Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) und dessen Einsatz im direkten Vergleich zu Indikator **11** ermöglichte Untersuchungen zur Rolle mitochondrialen chelatisierbaren Eisens bei der Zellschädigung durch Hypothermie. So konnte gezeigt werden, dass die kälteinduzierte Apoptose des Hepatozyten nicht durch einen Konzentrationsanstieg

des intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens begründet, sondern vermutlich durch extramitochondriale, redox-aktive Eisenionen vermittelt wird.



Neben den genannten, unerlässlichen Eigenschaften zur Eisen-Quantifizierung sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen zeichnen sich die neuen Fluoreszenzindikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) und auch die Referenzsubstanz Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) durch eine gute Photostabilität, eine ausreichend hohe Quantenausbeute in wässriger Lösung und eine geringe Cytotoxizität aus.

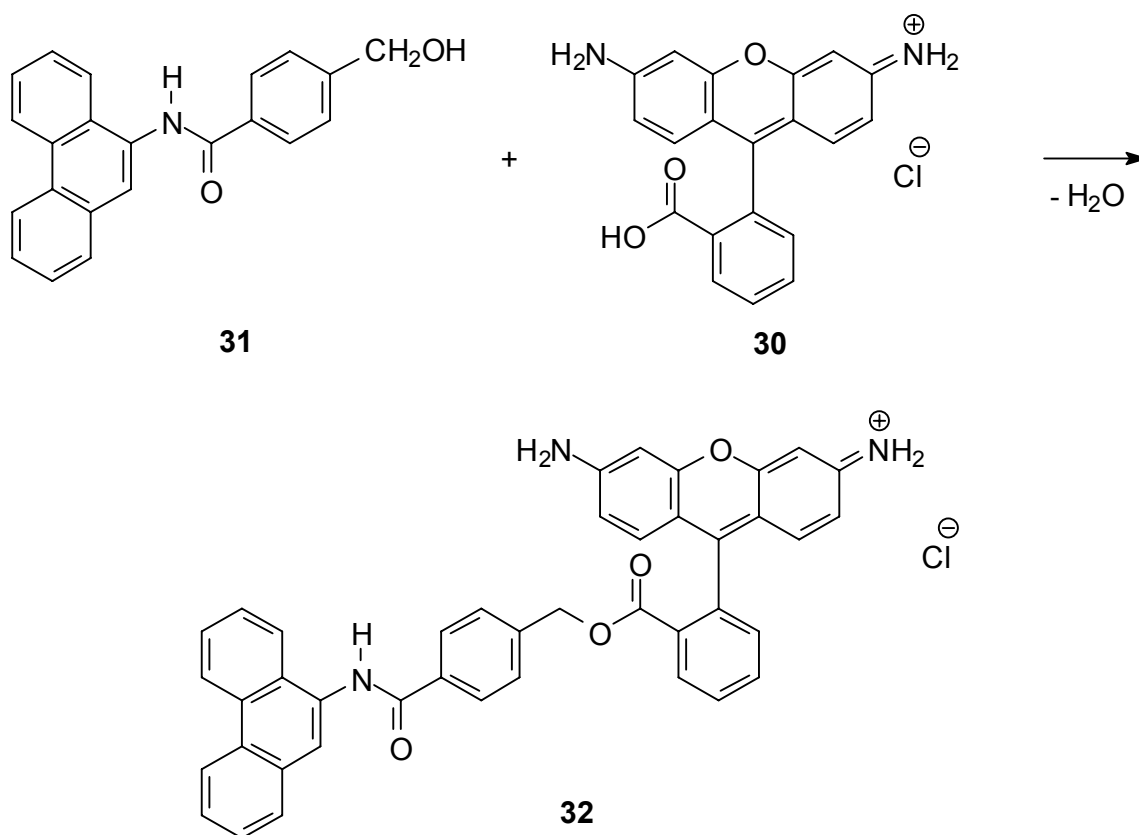
10 AUSBLICK

Vor allem im Hinblick auf pathobiochemische Fragestellungen sind zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten der neuen Fluoreszenzindikatoren denkbar. So konnte in weiterführenden Experimenten bereits bestätigt werden, dass intramitochondrial lokalisierte, chelatisierbare Eisenionen nicht für den kälteinduzierten Zellschädigungsprozess ausschlaggebend sind.^[139] Da die u. a. cytosolisch/nukleär lokalisierten Eisenchelatoren 1,10-Phenanthrolin und 2,2'-Dipyridyl nachweislich eine kälteinduzierte Zellschädigung inhibieren und auch die Fluoreszenzindikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und

Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) entsprechende redox-inaktive Eisenkomplexe bilden, sollten sie sich nicht nur als Eisen-Sensoren, sondern auch als Hemmstoffe zur gezielten Ausschaltung des Einflusses mitochondrialen chelatisierbaren Eisens eignen. Eine besonders vorteilhafte Eigenschaft dieser Hemmstoffe wäre ihre fluoreszenzmikroskopisch kontinuierlich verfolgbare subzelluläre Verteilung, die auch die Beurteilung des mitochondrialen Membranpotentials beinhaltet.

Des weiteren wäre die Anwendung der neu entwickelten Indikatoren zur Untersuchung humaner, neurodegenerativer Erkrankungen, die möglicherweise auf einen erhöhten chelatisierbaren Eisenpool in den Mitochondrien zurückzuführen sind, sehr interessant. So könnten Messungen der intramitochondrialen Konzentration chelatisierbaren Eisens bzw. einer Eisenakkumulation in intaktem humanen Zellmaterial von Friedreich-Ataxie-Patienten im direkten Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen endlich Aufschluss darüber geben, ob und in welchem Maße eine erhöhte Konzentration an chelatisierbarem Eisen in Mitochondrien vitaler Zellen für das Krankheitsbild (mit)verantwortlich ist.

Auch die Entwicklung einer fluoreszierenden Eisen-insensitiven Referenzsubstanz, deren Anregungsmaximum in einem Wellenlängenbereich um 488 nm und deren Emissionsmaximum - zum Erreichen einer besseren Signalisolation - um 540 nm anzusiedeln sein sollte, wäre hilfreich. So wäre die Möglichkeit der Membranpotential-Kontrolle durch Ratio-Messungen bei simultaner Beladung mit Indikator vor allem im Hinblick auf einen Einsatz unter pathophysiologischen Bedingungen gegeben. Hierzu wäre neben dem Austausch der eisenchelatisierenden Komponente 1,10-Phenanthrolin gegen den Eisen-insensitiven Baustein Phenanthren auch die Substitution von Rhodamin B z. B. durch das Fluorophor Rhodamin 110 (**30**) nötig. Dieser grün fluoreszierende Xanthen-Farbstoff ist als Hydrochlorid kommerziell erhältlich, besitzt in wässriger Pufferlösung ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 497 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 520 nm (pH = 7)^[111] und könnte beispielsweise durch Veresterung an 4-(Hydroxymethyl)-*N*-9-phenanthryl-benzamid (**31**) gekuppelt werden.



Eine parallele Beladung von Zellen mit rot fluoreszierendem Indikator und grün fluoreszierendem Referenzfarbstoff sollte auch Messungen mit anderen Verfahren, beispielsweise mittels Flow-Cytometrie, erlauben.

Die Fluoreszenzindikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) stellen bisher lediglich Prototypen fluoreszierender Eisenindikatoren für spezifische Zellkompartimente dar. Die Mitochondrien werden zwar als Hauptquelle der intrazellulären Bildung reaktiver Sauerstoffspezies für zahlreiche Zellschädigungsprozesse verantwortlich gemacht, dennoch sprechen nicht wenige Hinweise auch für die Existenz von Übergangspools chelatisierbaren Eisens in anderen Organellen. Die Entwicklung, Synthese und Anwendung weiterer ortsspezifischer Eisenindikatoren (z. B. für Lysosomen) würde eine Charakterisierung dieser Pools erlauben und könnte zur Aufklärung ihrer Rolle in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beitragen.

11 EXPERIMENTELLER TEIL

11.1 Instrumentelle Analytik

Die quantitative Bestimmung von Kupfer- und Eisenionen wurde mittels **Atomabsorptionsspektroskopie** mit dem Atomabsorptionsspektrometer 4100 ZL der Firma Perkin Elmer (Überlingen, Deutschland) am Institut für Arbeitsmedizin des Universitätsklinikums Essen vorgenommen.

Die CHN-**Elementaranalysen** wurden im mikroanalytischen Labor der Universität Essen mit einem Elemental Analyser 1010 CHNSO der Firma Carlo Erba (Mailand, Italien) erstellt.

Die **Fluoreszenzspektren** wurden mit Hilfe des Gerätes Fluoroscan FL 3095 der Firma J&M (Aalen, Deutschland) erhalten.

^1H - und ^{13}C -Kernresonanz-Spektren wurden mit den Geräten Gemini XL 200 der Firma Varian (200 MHz/50 MHz) (Darmstadt, Deutschland) bzw. DRX-500 der Firma Bruker (500 MHz/125 MHz) (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Zweidimensionale Spektren (gs-COSY 90, gs-HMBC, gs-HMQC) wurden ausschließlich mit dem Spektrometer DRX-500 erhalten. Die Angabe der chemischen Verschiebungen erfolgt in der Einheit ppm. Als interner Standard dienten jeweils die undeuterten Anteile der verwendeten deuterierten Lösungsmittel. Neben den konventionellen ^{13}C -NMR-Spektren wurden DEPT 135- sowie DEPT 90-Aufnahmen zur Produktcharakterisierung verwendet.

Die Aufnahme der **Infrarot-Spektren** erfolgte mit dem FT-IR-Spektrometer FTS 135 der Firma Bio-Rad (Cambridge, USA). Die Spektren wurden als KBr-Verreibung gemessen.

Die **intrazellulären Fluoreszenzmessungen** wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (inverses Mikroskop Axiovert 100 M mit LSM 510 Laser-Scanning-Modul

der Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem Argon- und einem Helium/Neon-Laser ausgerüstet. Der Argon-Laser mit 6.75 mW (= 45 % der Maximalleistung) Ausgangsleistung wurde zur Anregung bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$ verwendet. Der Helium/Neon-Laser mit 1 mW (= Maximalleistung) Ausgangsleistung wurde für die Anregung bei $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$ genutzt. Als Objektive mit numerischer Apertur wurden das 63x NA 1.40 Plan-Apochromat/Oil bzw. das 20x LD-Achroplan 0.4 Ph2 der Firma Zeiss eingesetzt. Als Emissionsfilter dienten Longpassfilter mit $\lambda_{\text{em.}} \geq 585 \text{ nm}$ oder $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$ sowie ein Filter mit $\lambda_{\text{em.}} \geq 505 - 530 \text{ nm}$. Die Temperierung der für die Messungen verwendeten Pentz-Kammern (hergestellt in der Werkstatt der Institutsgruppe I des Universitätsklinikums Essen) erfolgte durch einen elektrisch heizbaren Mikroskoptisch (Zeiss) bzw. durch einen flüssigkeitsgekühlten Mikroskoptisch, der mit einem Kryostaten (Thermomix BM, B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) verbunden war. Alle Messungen wurden im „Expert Mode“ der LSM 510-Software durchgeführt. Für qualitative und quantitative Fluoreszenzmessungen wurden die verschiedenen Parameter (Laserleistung, Detector Gain, Pinhole, Scan Time, Amplifying Gain, Auflösung, Numbers of Scan) stets so variiert, dass eine optimale Messung innerhalb des Detektormessbereiches möglich war. Für alle vergleichenden Messungen wurden identische Geräteeinstellungen verwendet. Zur Auswertung der Fluoreszenzmessungen wurde die Software „physiology evaluation“ des LSM 510-Systems genutzt. Die Messbereiche (*regions of interest*, ROI) wurden für jeden Messzeitpunkt manuell repositioniert und somit Objektbewegungen bzw. -veränderungen im Verlauf der Messung berücksichtigt.

Zur Bestimmung von Zeitverläufen wurde außerdem ein digitales Fluoreszenzmikroskopsystem (inverses Mikroskop Axiovert 135 TV der Firma Zeiss, gekoppelt mit dem bildgebenden Attofluor System, Atto Instruments, Rockville, MD, USA) verwendet. Die auch in diesem Fall eingesetzten Pentz-Messkammern können gleichfalls durch den Mikroskoptisch temperiert werden. Die Anregung der intrazellulären Indikatoren erfolgte in vorgegebenen Zeitintervallen durch eine Quecksilberdampfdrucklampe mit vorgeschalteter Verschlussblende (*Shutter*) unter Verwendung eines Anregungsfilters mit $\lambda_{\text{exc.}} \geq 535 \pm 17 \text{ nm}$, eines Emissionsfilters von $\lambda_{\text{em.}} \geq 590 \text{ nm}$ und des Strahlenteilers FT580. Eine digitale Kamera detektierte das passierende Fluoreszenzlicht, digitalisierte es und projizierte es bei Bedarf auf

einen Monitor. Nach der Wahl eines repräsentativen Gesichtsfeldes, konnte am Monitor des Attofluor-Systems für jede Zelle ein definierter Messbereich (ROI) ausgewählt werden. Die Verstärkereinstellung wurde auch für dieses Mikroskop-System stets so gewählt, dass die Intensität der intrazellulären Fluoreszenz sowohl unter Ausgangsbedingungen als auch nach entsprechender Einflussnahme innerhalb des Detektorbereiches lag.

Die Aufnahme der **Massenspektren** in Niederauflösung erfolgte mit einem Sektorfeld-Massenspektrometer VG Pro Spec 3000 der Firma Fisons Instruments (Manchester, Grossbritannien). Die Proben wurden im Direkteinlasssystem zugeführt. Als Ionisierungsmethoden wurden wahlweise Elektronenstoßionisation (EI, 70 eV) oder Fast Atom Bombardement (FAB, 40 kV, Caesiumkanone, Matrixmaterial: 3-Nitrobenzylalkohol oder Glycerin) eingesetzt. Die **hochaufgelöste Massenspektrometrie** erfolgte mit dem Gerät Bio TOF II der Firma Bruker (ESI - Elektrospray Ionisation) (Boston, USA). Zur Auswertung der hochaufgelösten Massenspektren wurde das Signal des Isotopenmusters mit der geringsten Masse (monoisotopic mass) ausgewählt.

Die angegebenen **pH-Werte** wurden mit dem pH-Meter 765 Calimatic der Firma Knick (Berlin, Deutschland) ermittelt.

Die **Schmelzpunktbestimmung** erfolgte mit dem Gerät 510 der Firma Büchi (Flawil, Schweiz) oder unter Verwendung eines Mikroskop-Heiztisches (Reichert Thermovar, Wien, Österreich). Die Werte sind unkorrigiert angegeben.

Für die **Ultraviolett/Visuell-spektroskopischen Messungen** standen ein Cary 219 der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) bzw. das Gerät Spectralys der Firma J&M (Aalen, Deutschland) zur Verfügung.

11.2 Materialien zur Synthese

1,10-Phenanthrolin Monohydrat, 4-Brommethyl-benzoesäure, Rhodamin B Base und Dimethylformamid wurden von der Firma Acros-Organics (Geel, Belgien) erhalten,

Phenanthren, Hydrazin Monohydrat, Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd), Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Natriumborhydrid, Kaliumcarbonat, Celite und Phosphortribromid von Fluka (Buchs, Schweiz). Wasserstoffperoxid (30 % H_2O_2), Rhodamin B Hydrochlorid, Eisessig, Essigsäureanhydrid, Dicyclohexylcarbodiimid, Phosphorpentoxid, *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin, Bromacetyl bromid, *N*-Hydroxysuccinimid und Triethylamin wurden von Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Magnesium- und Natriumsulfat, Oleum (25 % Schwefeltrioxid) sowie konzentrierte Schwefelsäure von Riedel de Haën (Seelze, Deutschland) und 2,2'-Dipyridyl von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Die Lösungsmittel Cyclohexan, n-Hexan, Tetrahydrofuran und Diethylether wurden von J. T. Baker (Deventer, Niederlande) erhalten, Toluol von Fisher Scientific (Leics, Großbritannien), Dichlormethan, Chloroform und 1,4-Dioxan von SDS (Peypin, Frankreich), Acetonitril von Biosolve LTD (Valkenswaard, Niederlande), Ethanol und Methanol von Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Ethylacetat von Applichem (Darmstadt, Deutschland). Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde unter Verwendung von kommerziell erhältlichen DC-Platten mit Fluoreszenzindikator auf neutralem bzw. basischem Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ oder auf Kieselgel (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Neutrales und basisches Aluminiumoxid für die Säulenchromatographie, erhalten von Fluka, wurde zum Teil mit 7.0 % Wasser (resultierende Aktivitätsstufe III nach Brockmann^[140]) in einer standardisierten Methode deaktiviert. Dazu wurde das Deaktivierungsmittel Wasser in abgewogener Menge zum Adsorbens in eine verschließbare Flasche gegeben und solange geschüttelt, bis keine Verklumpung des oxidischen Sorptionsmittels mehr erkennbar war. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur konnte das deaktivierte Aluminiumoxid sofort eingesetzt werden.

11.3 Trocknung der Lösungsmittel

Zur Feintrocknung wurde **Acetonitril** zehn Stunden über Calciumhydrid unter Rückfluss erhitzt und im Anschluss destilliert.

Dimethylformamid wurde durch Destillation und anschließende Filtration über neutralem Aluminiumoxid absolutiert.

Ethanol wurde pro Liter mit 7.00 g Natrium und 27.5 g Phthalsäurediethylester versetzt und im Anschluss zwei Stunden erhitzt und danach destilliert.

Tetrahydrofuran und **1,4-Dioxan** wurden mit Natrium zum Sieden erhitzt, bis sich aus dem zugesetzten Indikator *p*-Phenylbenzophenon das violett-gefärbte Ketylradikal gebildet hatte.^[141] Danach destillierte man in ein Vorratsgefäß.

Nach dem Trocknungsvorgang wurden alle Lösungsmittel über Molekularsieb unter Schutzgas aufbewahrt.

Alle verwendeten **deutერიerten Lösungsmittel** wurden über Molekularsieb getrocknet und aufbewahrt.

11.4 Materialien für biologische Anwendungen

Leibovitz L-15 Medium und RPMI 1640-Medium wurden erhalten von der Firma Gibco (Eggenstein, Deutschland), Penizillin/Streptomycin von PAA Laboratories (Linz, Österreich), Fibronectin von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Kollagen (type R), Dexamethason, Rinderserumalbumin und Gentamicin von Serva (Heidelberg, Deutschland). Dimethylsulfoxid (DMSO) und Trinatriumcitrat Dihydrat wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland), Natriumdodecylsulfat (SDS), fötales Kälberserum, Eisen(II)ammoniumsulfat Hexahydrat, FeCl₃, 8-Hydroxychinolin, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), L-Glutamin, Kollagenase, Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) und Propidiumiodid von Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Chelex 100 (Polystyrol-divinylbenzoliminodiacetat), Glukose, Glutathion und Ascorbinsäure von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) sowie die Metallsalze MnCl₂, NiSO₄, CuCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuCl von Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erhalten. Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 wurden bei Molecular Probes Europa BV (Leiden, Niederlande) beschafft. Pyridoxalisonicotinoylhydrazon wurde dankenswerterweise von Prof. Dr. P. Ponka (Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Kanada) überlassen. Falcon Zellkulturflaschen und Falcon 6-well Zellkulturschalen wurden von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Eppendorf-Cups von Sarstedt

(Nümbrecht, Deutschland) und Glas-Deckplättchen von Assistent (Sondheim/Röhn, Deutschland) bezogen.

Das Wasch- und Inkubationsmedium Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH = 7.35) wurde aus 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 1.26 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.41 mM MgSO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 25.0 mM 2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES) in Wasser hergestellt. Alle dazu benötigten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Das Medium zur Simulation der mitochondrialen Matrix (pH = 8.2) bestand aus 30.0 mM KCl, 6.00 mM MgCl₂, 4.00 mM K₃PO₄ · 7 H₂O, 1.10 mM CaCl₂, 1.00 mM NaCl,^[141] 6.85 mM Glukose, 0.23 mM Trinatriumcitrat Dihydrat, 6.00 mM ATP,^[143] 6.00 mM NADPH, 4.00 mM NADH, 10.0 mM Glutathion,^[144] 1.00 mM Ascorbinsäure,^[145] 1.75 M Saccharose^X, 0.18 % w/v SDS, 10.0 mM Tris/HCl. Zum Teil wurden die Konzentrationen in Anlehnung an literaturbekannte Angaben zu Proteingehalt und Volumen von Rattenlebermitochondrien angefertigt.^[142] Alle Komponenten wurden in bidestilliertem Wasser gelöst, entsprechend Kapitel 11.7.1 mit Chelex 100 behandelt und im Anschluss der pH-Wert eingestellt. Glutathion und Ascorbinsäure wurden erst zwei bis vier Stunden vor der jeweiligen Messung hinzugegeben, da beide Reduktionsmittel unter den vorherrschenden normoxischen Bedingungen schnell oxidiert werden. Die Zugabe des Lösungsvermittlers SDS erfolgte stets nach pH-Einstellung.

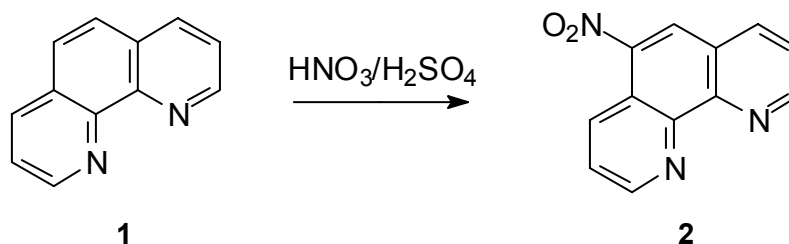
11.5 Versuchstiere

Für die Hepatozytenisolation wurden männliche Ratten des Wistar-Stammes (180 - 350 g) vom Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen bezogen. Sie wurden unter Standardbedingungen (Temperatur: 21 ± 2 °C, relative Luftfeuchte: 55 ± 5 %, konstanter Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden, Standardfutter und Wasser *ad libitum*) in Übereinstimmung mit den geltenden Tierschutzgesetzen gehalten.

^X Saccharose wurde lediglich in einer Versuchsserie zum Ausschluss eines Einflusses der Viskosität auf die Fluoreszenz bzw. die Eisen-induzierte Fluoreszenzlöschung eingesetzt.

11.6 Synthese der Fluoreszenzindikatoren

11.6.1 5-NITRO-1,10-PHENANTHROLIN (**2**)^[113]

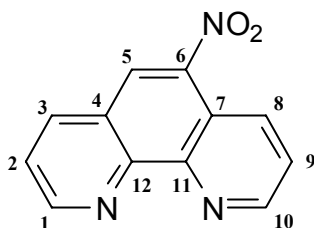


In einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Innenthermometer und Tropftrichter wurden 25.0 g ($M = 198.23 \text{ g/mol}$, 126 mmol) 1,10-Phenanthrolin Monohydrat (**1**) in 125 mL Oleum (25 % SO_3) gelöst. Zu der orangefarbenen Lösung wurden im Anschluss unter Rühren 67.0 mL Salpetersäure (70 %) so zugetropft, dass die Temperatur der Reaktionsmischung nie über 130°C anstieg. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung weitere 20 Minuten unter Rückfluss gehalten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung vorsichtig und unter Rühren auf 2000 g Eis gegossen. Nach der Zugabe von 30proz. Natriumhydroxidlösung bis zur Neutralität und dem Abkühlen der Mischung wurde der ausgefallene beige-braune Niederschlag über eine D3-Glasfritte abfiltriert. Nach Trocknung des Rohproduktes wurde aus Ethanol umkristallisiert. 5-Nitro-1,10-phenanthrolin (**2**) wurde in Form eines gelben Pulvers erhalten.

Ausbeute: 17.9 g (79.7 mmol) 5-Nitro-1,10-phenanthrolin (**2**), 63 %

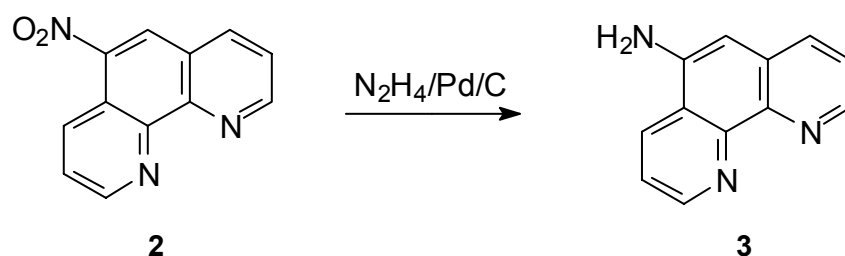
Schmelzpunkt: 196°C (Lit.^[113]: $197\text{--}198^\circ\text{C}$)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 7.93 (dd, 1 H, 2-H, $^3J\{2\text{-H},1\text{-H}\} = 4.3$ Hz, $^3J\{2\text{-H},3\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 7.96 (dd, 1 H, 9-H, $^3J\{9\text{-H},10\text{-H}\} = 4.4$ Hz, $^3J\{9\text{-H},8\text{-H}\} = 8.6$ Hz), 8.76 (dd, 1 H, 3-H, $^3J\{3\text{-H},2\text{-H}\} = 8.2$ Hz, $^4J\{3\text{-H},1\text{-H}\} = 1.7$ Hz), 8.87 (dd, 1 H, 8-H, $^3J\{8\text{-H},9\text{-H}\} = 8.6$ Hz, $^4J\{8\text{-H},10\text{-H}\} = 1.8$ Hz), 9.01 (s, 1 H, 5-H), 9.23 (dd, 1 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 4.3$ Hz, $^4J\{1\text{-H},3\text{-H}\} = 1.7$ Hz), 9.28 (dd, 1 H, 10-H, $^3J\{10\text{-H},9\text{-H}\} = 4.4$ Hz, $^4J\{10\text{-H},8\text{-H}\} = 1.8$ Hz).

11.6.2 1,10-PHENANTHROLIN-5-AMIN (**3**)^[114]

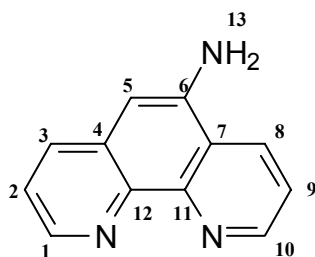


Unter Schutzgasatmosphäre wurden 10.0 g ($M = 225.09$ g/mol, 44.4 mmol) 5-Nitro-1,10-phenanthroline (**2**) in 500 mL Ethanol p.a. vorgelegt und 2.00 g Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) im leichten Inertgasstrom hinzugegeben. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 10.0 mL (10.3 g, 206 mmol) Hydrazin Monohydrat in 100 mL Ethanol tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung im Anschluss fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, Chloroform/Methanol = 7:1 v/v) verfolgt. Das Reaktionsende wird außerdem durch nachlassende Gasentwicklung angezeigt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung über Celite (30.0 g) filtriert. Das Volumen des orangefarbenen Filtrats wurde am Rotationsverdampfer auf 100 mL reduziert. Durch Versetzen der viskosen Lösung mit 300 mL kaltem Wasser setzte die Kristallisation des Produktes ein. Nach Filtration und Trocknung im Exsikkator über Phosphorpentoxid wurde 1,10-Phenanthroline-5-amin (**3**) in Form gelber Nadeln erhalten.

Ausbeute: 6.15 g (31.5 mmol) 1,10-Phenanthroline-5-amin (**3**), 71 %

Schmelzpunkt: 261 °C (Lit.^[114]: 259-260 °C)

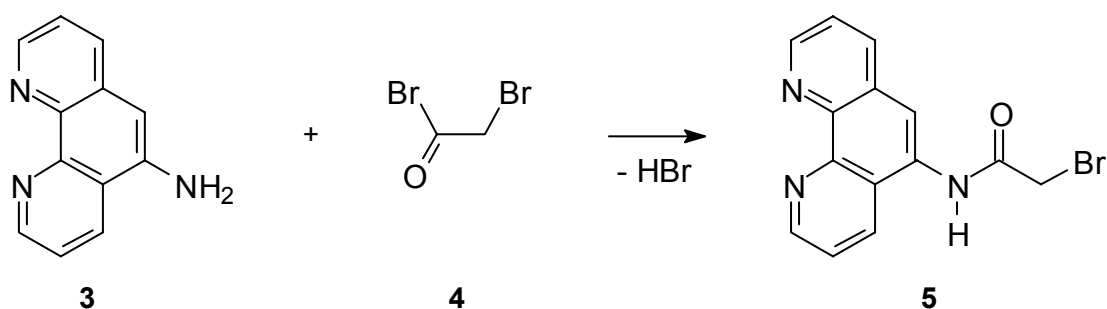
Charakterisierung:



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6.13 (s, 2 H, 13-H), 6.85 (s, 1 H, 5-H), 7.49 (dd, 1 H, 2-H, ³J{2-H,3-H} = 8.1 Hz, ³J{2-H,1-H} = 4.3 Hz), 7.72 (dd, 1 H, 9-H, ³J{9-H,8-H} = 8.4 Hz, ³J{9-H,10-H} = 4.2 Hz), 8.03 (dd, 1 H, 3-H, ³J{3-H,2-H} = 8.2 Hz, ⁴J{3-H,1-H} = 1.7 Hz), 8.66 - 8.68 (m, 2 H, 8-H, 1-H), 9.04 (dd, 1 H, 10-H, ³J{10-H,9-H} = 4.2 Hz, ⁴J{10-H,8-H} = 1.6 Hz).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 101.72 (5-C), 121.78 (7-C), 122.02 (9-C), 123.15 (2-C), 130.54 (4-C), 130.77 (8-C), 132.66 (3-C), 140.50 (11-C/12-C), 142.64 (6-C), 144.78 (1-C), 146.17 (11-C/12-C), 149.30 (10-C).

11.6.3 2-BROM-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID (**5**)



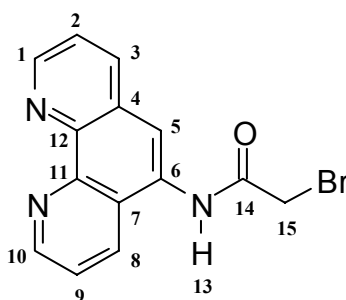
In 70.0 mL absolutem Acetonitril wurden 1.00 g (M = 195.22 g/mol, 5.13 mmol) 1,10-Phenanthroline-5-ylamin (**3**) vorgelegt. Eine Lösung von 0.90 mL (2.07 g, 10.3 mmol) Bromacetyl bromid (**4**) in 30.0 mL absolutem Acetonitril wurde tropfenweise und unter Rühren bei Raumtemperatur zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei

Raumtemperatur 15 Stunden gerührt, der entstandene orangefarbene Niederschlag über eine D4-Glasfritte abfiltriert und im Anschluss aufeinanderfolgend mit 10.0 mL Acetonitril gewaschen, zweimal mit je 10.0 mL 5.00proz. wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung aufgeschlämmt und abfiltriert sowie zweimal mit je 20.0 mL Wasser gewaschen. Die Trocknung des lachsfarbenen Feststoffes **5** erfolgte im Exsikkator über Phosphorpentoxid.

Ausbeute: 1.23 g (3.89 mmol) 2-Brom-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**5**), 76 %

Zersetzungspunkt: 230 °C

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 4.28 (s, 2 H, 15-H), 7.75 (dd, 1 H, 2-H, $^3J\{2\text{-H},3\text{-H}\} = 8.1$ Hz, $^3J\{2\text{-H},1\text{-H}\} = 4.3$ Hz), 7.85 (dd, 1 H, 9-H, $^3J\{9\text{-H},8\text{-H}\} = 8.4$ Hz, $^3J\{9\text{-H},10\text{-H}\} = 4.3$ Hz), 8.18 (s, 1 H, 5-H), 8.49 (dd, 1 H, 3-H, $^3J\{3\text{-H},2\text{-H}\} = 8.1$ Hz, $^4J\{3\text{-H},1\text{-H}\} = 1.5$ Hz), 8.62 (dd, 1 H, 8-H, $^3J\{8\text{-H},9\text{-H}\} = 8.4$ Hz, $^4J\{8\text{-H},10\text{-H}\} = 1.1$ Hz), 9.05 (dd, 1 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 4.3$ Hz, $^4J\{1\text{-H},3\text{-H}\} = 1.4$ Hz), 9.14 (dd, 1 H, 10-H, $^3J\{10\text{-H},9\text{-H}\} = 4.3$ Hz, $^4J\{10\text{-H},8\text{-H}\} = 1.4$ Hz), 10.59 (s, 1 H, 13-H).

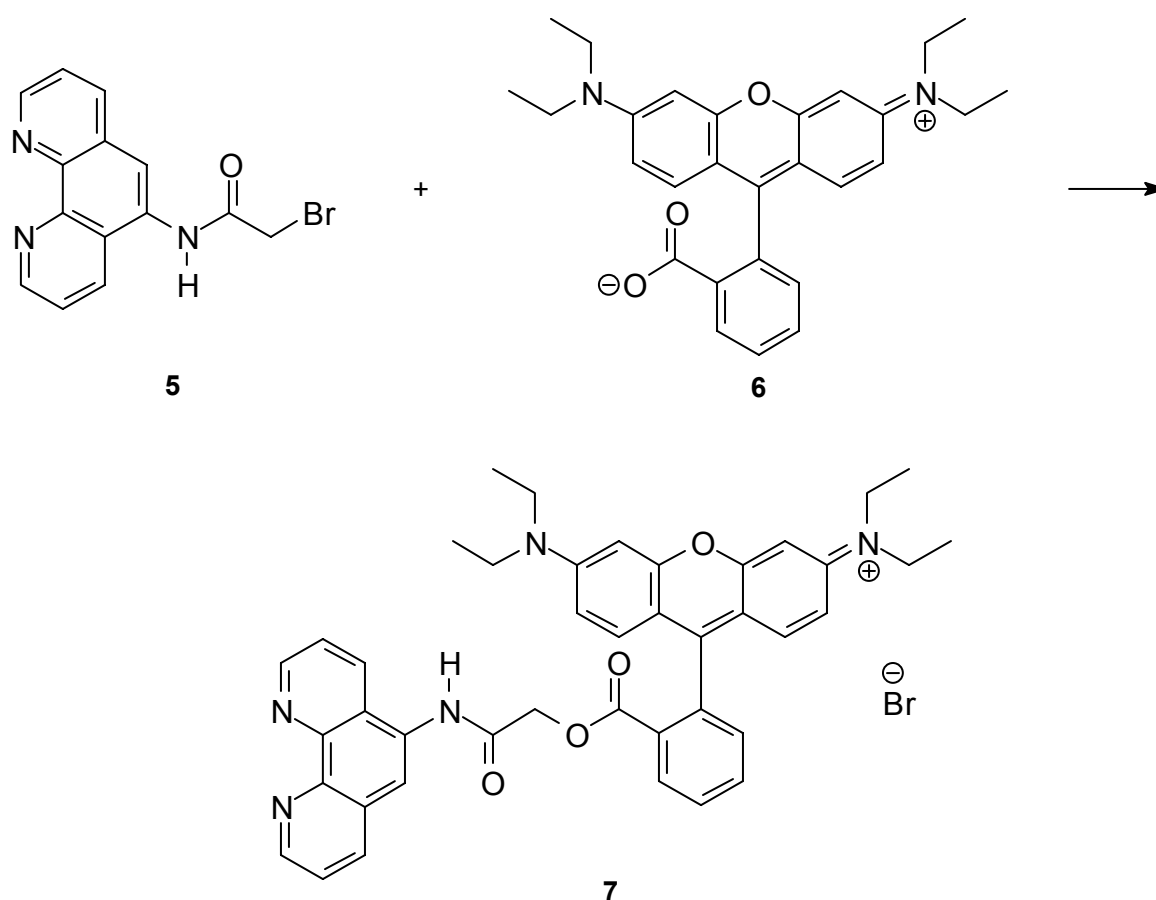
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 29.98 (15-C), 120.47 (5-C), 122.96 (9-C), 123.64 (2-C), 124.48 (4-C), 127.92 (6-C), 131.03 (7-C), 131.39 (8-C), 136.08 (3-C), 143.82, 145.69 (11-C, 12-C), 149.53 (1-C), 149.98 (10-C), 166.18 (14-C).

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3188, 3150 (m, $\nu(\text{NH})$), 3069, 3038, 3003 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$), 1686 (s, $\nu(\text{CO}_{\text{Amid}})$), 1537 (s, $\delta(\text{NH}_{\text{Amid}})$).

Elementaranalyse:

berechnet (für $C_{14}H_{10}N_3OBr$):	C 53.19	H 3.19	N 13.29
gefunden:	C 52.89	H 3.06	N 13.01.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 316 (3) $[M^+]$, 236 (10) $[M^+-Br]$, 195 $[M^+-C_2H_3NBr]$.

11.6.4 RHODAMIN B-[(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)AMINOCARBONYL]METHYLESTER (**7**)

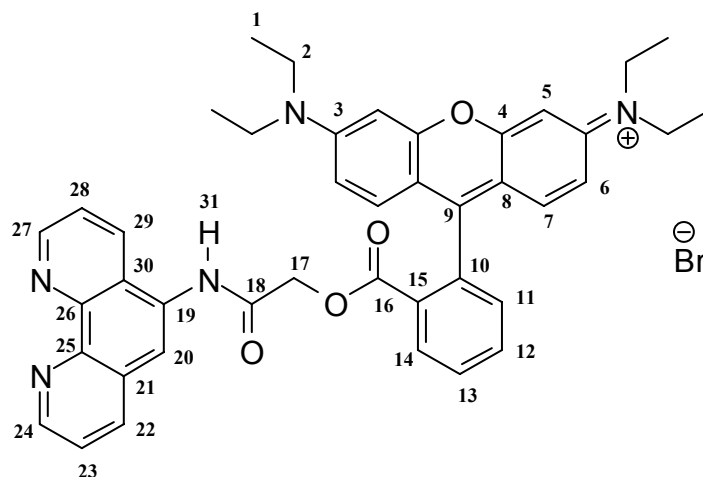
Eine Lösung von 1.33 g ($M = 442.55$ g/mol, 3.00 mmol) Rhodamin B Base (**6**) und 0.95 g ($M = 316.16$ g/mol, 3.00 mmol) 2-Brom-*N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)acetamid (**5**) in 20.0 mL absolutem Dimethylformamid wurde 67 Stunden bei einer Temperatur von 100 - 110 °C gerührt. Im Anschluss wurde Dimethylformamid im Ölpumpenvakuum bei einer Badtemperatur < 80°C vollständig abkondensiert. Der dunkellila gefärbte Rückstand wurde in 40.0 mL warmem Dichlormethan aufgenommen,

unlösliche Bestandteile abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt konnte durch Säulenchromatographie an deaktiviertem neutralem Aluminiumoxid mit dem Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/n-Hexan/ Ethanol (1. 10:4:1 und 2. 10:2:1 v/v/v) gereinigt werden. Die Verweilzeit des Produktes **7** auf der Säule musste trotz Deaktivierung des Säulenmaterials aufgrund von Zersetzungserscheinungen auf ein Minimum reduziert werden. Die tiefrot gefärbten Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (neutrales Aluminiumoxid, Dichlormethan/n-Hexan/Ethanol = 8:1:1 v/v/v). Die vereinigten Produktfraktionen ($R_f = 0.25$) wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonylmethylester (**7**) wurde als dunkelroter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 228 mg (0.30 mmol) Rhodamin B-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonylmethylester (**7**), 10 %

Schmelzpunkt: 199 °C

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.18 (t, 12 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 6.9$ Hz), 3.40 (q, 8 H, 2-H, $^3J\{2\text{-H}, 1\text{-H}\} = 7.0$ Hz), 5.24 (s, 2 H, 17-H), 6.57 (d, 2 H, 5-H, $^4J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 6.73 (dd, 2 H, 6-H, $^3J\{6\text{-H}, 7\text{-H}\} = 9.6$ Hz, $^4J\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.18 (d, 2 H, 7-H, $^3J\{7\text{-H}, 6\text{-H}\} = 9.5$ Hz), 7.20 - 7.22 (m, 1 H, 11-H), 7.48 - 7.52 (m, 2 H, 23-H, 28-H), 7.70 - 7.74 (m, 2 H, 12-H, 13-H), 8.07 (s, 1 H, 20-H), 8.10 (dd, 1 H, 29-H,

$^3J\{29\text{-H},28\text{-H}\} = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J\{29\text{-H},27\text{-H}\} = 1.7 \text{ Hz}$, 8.47 - 8.49 (m, 1 H, 14-H), 8.77 (dd, 1 H, 22-H, $^3J\{22\text{-H},23\text{-H}\} = 6.9 \text{ Hz}$, $^4J\{22\text{-H},24\text{-H}\} = 1.4 \text{ Hz}$), 9.03 (dd, 1 H, 27-H, $^3J\{27\text{-H},28\text{-H}\} = 4.4 \text{ Hz}$, $^4J\{27\text{-H},29\text{-H}\} = 1.7 \text{ Hz}$), 9.07 (dd, 1 H, 24-H, $^3J\{24\text{-H},23\text{-H}\} = 4.3 \text{ Hz}$, $^4J\{24\text{-H},22\text{-H}\} = 1.6 \text{ Hz}$), 10.80 (s, 1 H, 31-H).

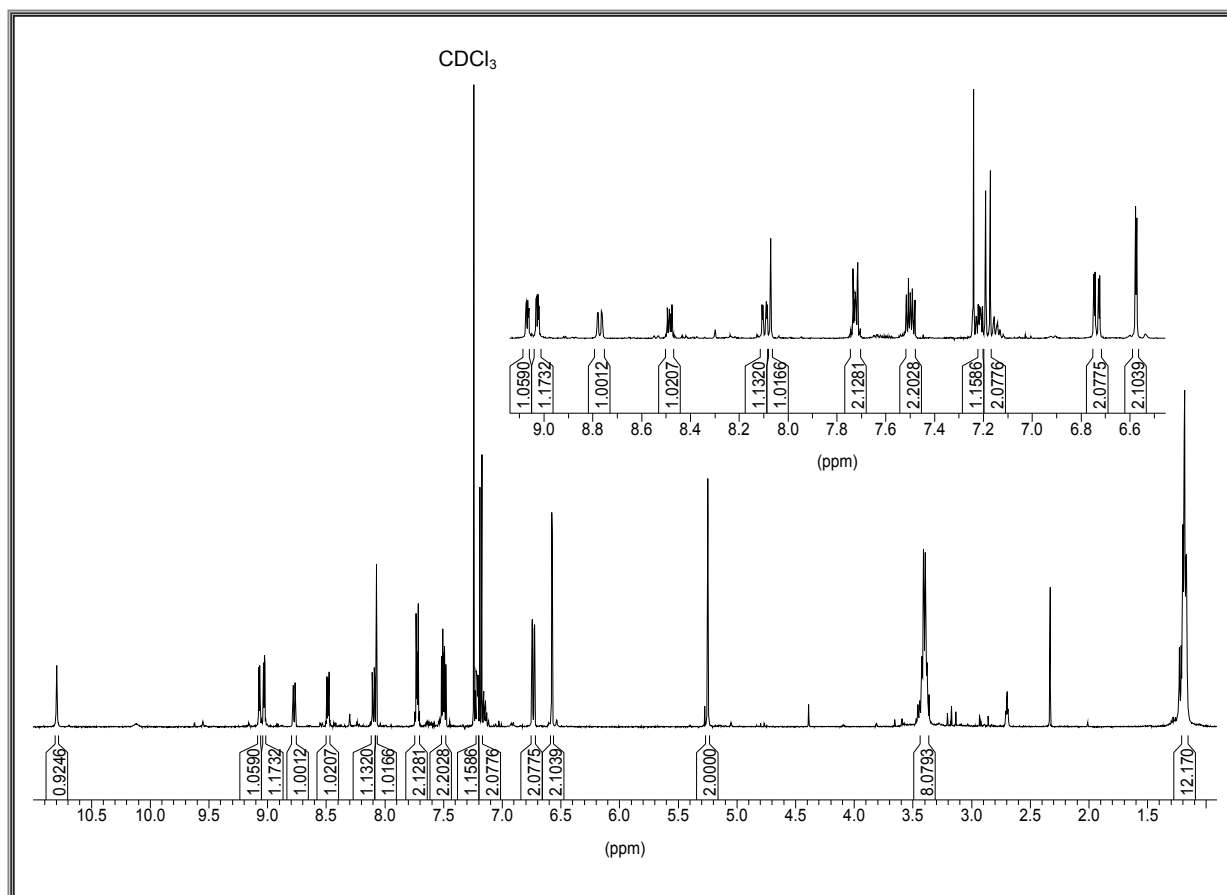


Abbildung 32: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Indikator **7** in CDCl_3

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.57 (1-C), 45.95 (2-C), 65.08 (17-C), 95.97 (5-C), 113.65 (3-C), 114.24 (6-C), 120.26 (20-C), 122.75, 123.03 (23-C, 28-C), 125.20, 128.20, 130.41, 131.83, 133.41 (10-C, 15-C, 19-C, 21/30-C, 25/26-C), 129.58 (11-C), 130.46 (12-C), 131.79 (7-C), 132.14 (14-C), 132.58 (13-C), 133.57 (22-C), 136.08 (29-C), 149.07 (24-C), 149.54 (27-C), 155.35 (8-C), 157.69 (4-C), 159.12 (9-C), 164.86 (16-C), 167.35 (18-C).

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3425 (m, $\nu(\text{NH})$), 2973 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$), 1724 (m, $\nu(\text{C=O}_{\text{Ester}})$), 1647 (s, $\nu(\text{CO}_{\text{Amid I}})$), 1587 (s, $\nu(\text{CO}_{\text{Amid II}})$), 1180 (s, $\nu(\text{C-O}_{\text{Ester}})$).

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) 678 (100) [$\text{M}^+ - \text{Br}$], 443 (23) [Rhodamin B Base + H^+].

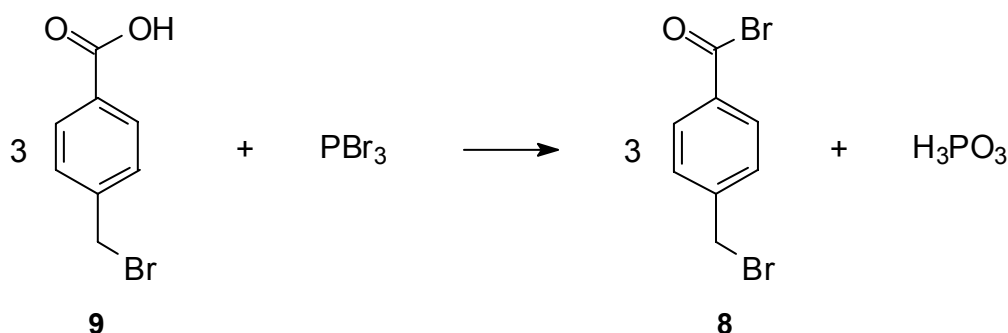
HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Ethanol):

berechnet (für $\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_4$): 678.3080

gefunden: 678.3086

Abweichung: 0.9 ppm.

11.6.5 4-BROMMETHYL-BENZOYLBROMID (**8**)^[115]



Eine Mischung von 10.1 g ($M = 215.05 \text{ g/mol}$, 47.0 mmol) 4-Bromomethyl-benzoesäure (**9**) und 30.0 mL ($M = 270.69 \text{ g/mol}$, 0.32 mol) Phosphortribromid wird fünf Stunden unter Rückfluss gerührt. Die entstehende hellgelbe viskose Lösung wird vom orangegelb gefärbten Niederschlag abdekantiert und flüchtige Bestandteile im Ölpumpenvakuum bei einer Temperatur von 50 °C abkondensiert. Der gelbe Rückstand wird in 100 mL Toluol aufgenommen, unlösliche Bestandteile unter Schutzgas abfiltriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Toluolzugabe, Filtration und Entfernung des Lösungsmittels wurden zum Erhalt der analysenreinen Verbindung ein zweites Mal durchgeführt. 4-Bromomethyl-benzoylbromid (**8**) fällt in Form farbloser Kristalle an.

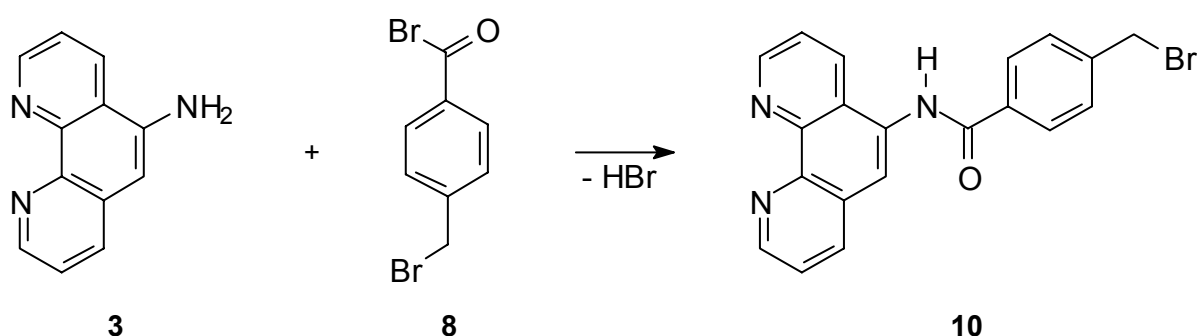
Ausbeute: 12.1 g (43.5 mmol) 4-Bromomethyl-benzoylbromid (**8**), 93 %

Schmelzpunkt: 60 °C (Lit.^[115]: 60 °C)

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3000 (w, ν (CH_{Aryl})), 2875 (w, ν (CH_{Aliph})), 1750 (s, ν (C=O)), 787 (m, ν (C-Br)).

Die Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie musste aufgrund von sofortiger Zersetzung des gelösten Produktes entfallen.

11.6.6 4-(BROMMETHYL)-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)BENZAMID (**10**)

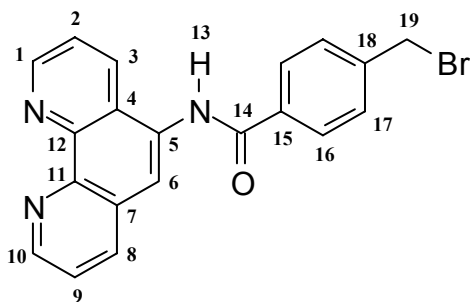


Zur Synthese von 4-(Brommethyl)-*N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)benzamid (**10**) wurden zunächst 2.39 g (M = 277.94 g/mol, 8.60 mmol) 4-Brommethyl-benzoylbromid (**9**) in 50.0 mL absolutem Acetonitril gelöst und tropfenweise und unter Rühren zu einer Suspension von 1.30 g (M = 195.22 g/mol, 6.70 mmol) 1,10-Phenanthroline-5-amin (**3**) in 100 mL absolutem Acetonitril gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss der orangefarbene Feststoff über eine D4-Glasfritte abfiltriert. Aufeinanderfolgend wurde der Feststoff mit 10.0 mL Acetonitril gewaschen, zweimal mit je 20.0 mL 5.00proz. wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung aufgeschlämmt und abfiltriert sowie zweimal mit je 20.0 mL Wasser gewaschen. Die Trocknung des hellgelben Feststoffes (**10**) erfolgte im Exsikkator über Phosphorpentoxid.

Ausbeute: 2.32 g (5.91 mmol) 4-(Brommethyl)-*N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)benzamid (**10**), 88 %

Zersetzung: > 230 °C

Charakterisierung:

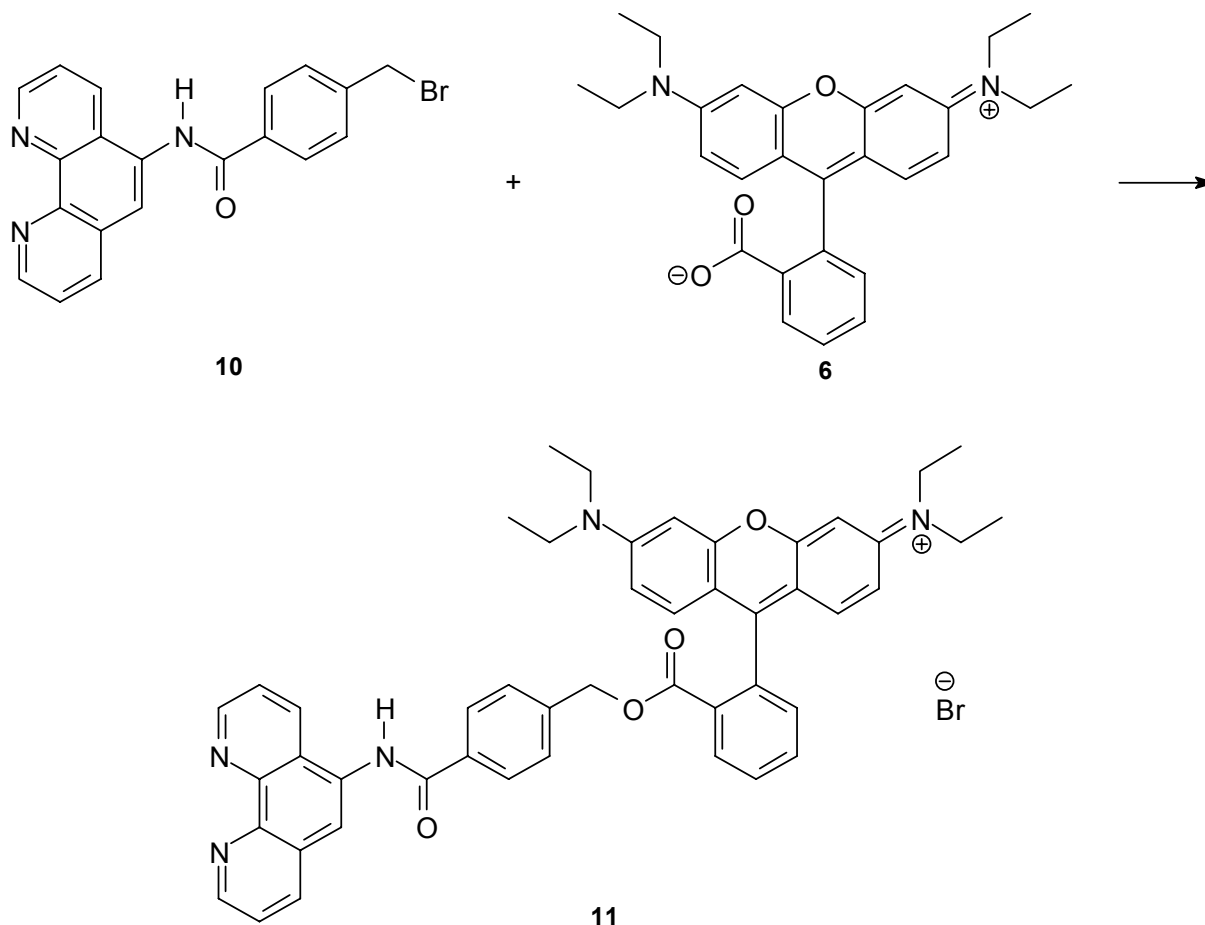


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 4.82 (s, 2 H, 19-H), 7.67 (d, 2 H, 17-H, $^3J\{17\text{-H}, 16\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 8.13 - 8.16 (m, 3 H, 9-H, 16-H, $^3J\{16\text{-H}, 17\text{-H}\} = 8.3$ Hz), 8.20 (dd, 1 H, 2-H, $^3J\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.2$ Hz, $^3J\{2\text{-H}, 1\text{-H}\} = 5.0$ Hz), 8.49 (s, 1 H, 6-H), 8.98 (dd, 1 H, 8-H, $^3J\{8\text{-H}, 9\text{-H}\} = 8.5$ Hz, $^4J\{8\text{-H}, 10\text{-H}\} = 1.1$ Hz), 9.09 (dd, 1 H, 3-H, $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.2$ Hz, $^4J\{3\text{-H}, 1\text{-H}\} = 1.0$ Hz), 9.24 (dd, 1 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H}, 2\text{-H}\} = 4.9$ Hz, $^4J\{1\text{-H}, 3\text{-H}\} = 1.3$ Hz), 9.31 (dd, 1 H, 10-H, $^3J\{10\text{-H}, 9\text{-H}\} = 4.6$ Hz, $^4J\{10\text{-H}, 8\text{-H}\} = 1.1$ Hz), 10.99 (s, 1 H, 13-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 33.39 (19-C), 121.59 (6-C), 125.06 (9-C), 125.48 (2-C), 126.36 (7-C), 128.52 (16-C), 129.21 (4-C), 129.39 (17-C), 133.48, 133.62 (15-C, 18-C), 136.67 (8-C), 139.17 (5-C), 141.96 (3-C), 142.22 (11-C, 12-C), 146.46 (1-C), 148.92 (10-C), 166.31 (14-C).

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3434, 3212 (m, $\nu(\text{NH})$), 3088 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$), 2986 (CH_{Aliph}), 1678 (s, $\nu(\text{CO}_{\text{Amid I}})$), 1594 (s, $\nu(\text{CO}_{\text{Amid II}})$), 1537 (s, $\delta(\text{NH}_{\text{Amid}})$), 1511 (s, $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{Aryl}})$).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 392 (2) [M^+], 313 (30) [$\text{M}^+ - \text{Br}$], 195 (37) [$\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_5\text{BrO}$], 119 (100) [$\text{M}^+ - \text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_3\text{Br}$].

11.6.7 RHODAMIN B-4-[(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)AMINOCARBONYL]BENZYLESTER (**11**)

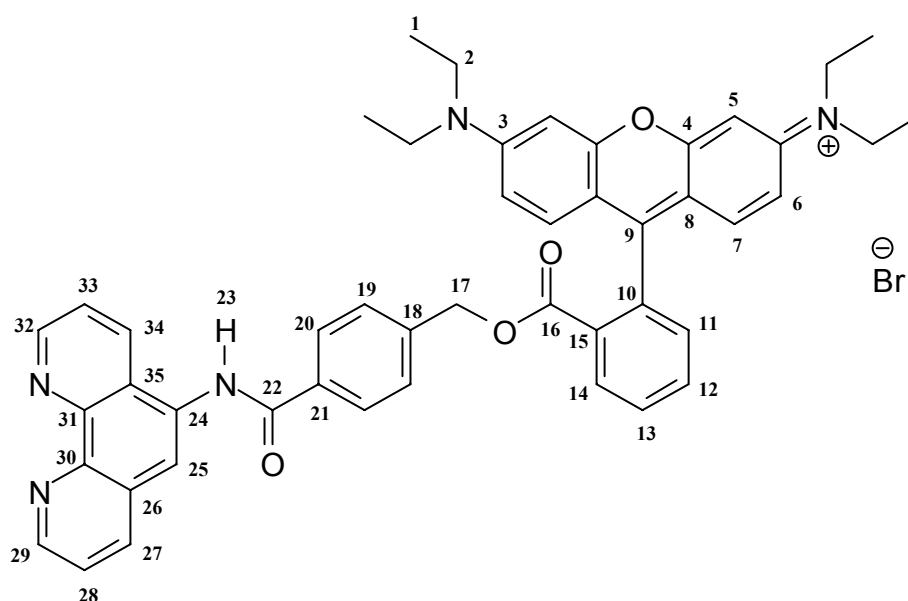
Eine Lösung von 1.00 g ($M = 442.55 \text{ g/mol}$, 2.26 mmol) Rhodamin B Base (**6**) und 0.89 g ($M = 392.25 \text{ g/mol}$, 2.26 mmol) 4-(Brommethyl)-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (**10**) in 15.0 mL absolutem Dimethylformamid wurde über einen Zeitraum von 64 Stunden bei einer Temperatur von 100 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum bei einer Badtemperatur < 50 °C vollständig abkondensiert. Der dunkellila gefärbte Rückstand wurde in 20.0 mL warmem Dichlormethan aufgenommen, unlösliche Bestandteile abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt konnte durch Säulenchromatographie an deaktiviertem neutralem Aluminiumoxid mit dem Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/*n*-Hexan/Ethanol (1. 10:4:1 und 2. 10:2:1 v/v/v) gereinigt werden. Die tiefrot gefärbten Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch analysiert (neutrales Aluminiumoxid, Dichlormethan/*n*-Hexan/ Ethanol = 8:1:1 v/v/v). Die vereinigten Produktfraktionen ($R_f = 0.35$) wurden am Rotations-

verdampfer vom Lösungsmittel befreit und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) wurde als dunkelroter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 370 mg (0.44 mmol) Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**), 20 %

Schmelzpunkt: 182 °C

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.20 (t, 12 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 7.1$ Hz), 3.41 - 3.62 (m, 8 H, 2-H), 4.88 (s, 2 H, 17-H), 6.72 (dd, 2 H, 6-H, $^3J\{6\text{-H},7\text{-H}\} = 9.5$ Hz, $^4J\{6\text{-H},5\text{-H}\} = 2.4$ Hz), 6.82 (d, 2 H, 19-H, $^3J\{19\text{-H},20\text{-H}\} = 8.3$ Hz), 6.89 (d, 2 H, 5-H, $^4J\{5\text{-H},6\text{-H}\} = 2.4$ Hz), 6.93 (d, 2 H, 7-H, $^3J\{7\text{-H},6\text{-H}\} = 9.5$ Hz), 7.18 - 7.20 (m, 1 H, 11-H), 7.48 - 7.53 (2 dd, 2 H, 28-H, 33-H, $^3J\{28\text{-H},27\text{-H}\} = 8.0$ Hz, $^3J\{28\text{-H},29\text{-H}\} = 4.3$ Hz, $^3J\{33\text{-H},34\text{-H}\} = 8.4$ Hz, $^3J\{33\text{-H},32\text{-H}\} = 4.2$ Hz), 7.67 - 7.78 (m, 2 H, 12-H, 13-H), 8.11 (s, 1 H, 25-H), 8.15 (dd, 1 H, 27-H, $^3J\{27\text{-H},28\text{-H}\} = 8.1$ Hz, $^4J\{27\text{-H},29\text{-H}\} = 1.7$ Hz), 8.28 - 8.30 (m, 1 H, 14-H), 8.39 (d, 2 H, 20-H, $^3J\{20\text{-H},19\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 8.61 (dd, 1 H, 34-H, $^3J\{34\text{-H},33\text{-H}\} = 8.3$ Hz, $^4J\{34\text{-H},32\text{-H}\} = 1.7$ Hz), 9.02 - 9.05 (m, 2 H, 29-H, 32-H, $^3J\{29\text{-H},28\text{-H}\} = 4.3$ Hz, $^4J\{29\text{-H},27\text{-H}\} = 1.7$ Hz, $^3J\{32\text{-H},33\text{-H}\} = 4.5$ Hz, $^4J\{32\text{-H},34\text{-H}\} = 1.7$ Hz), 11.81 (s, 1 H, 23-H).

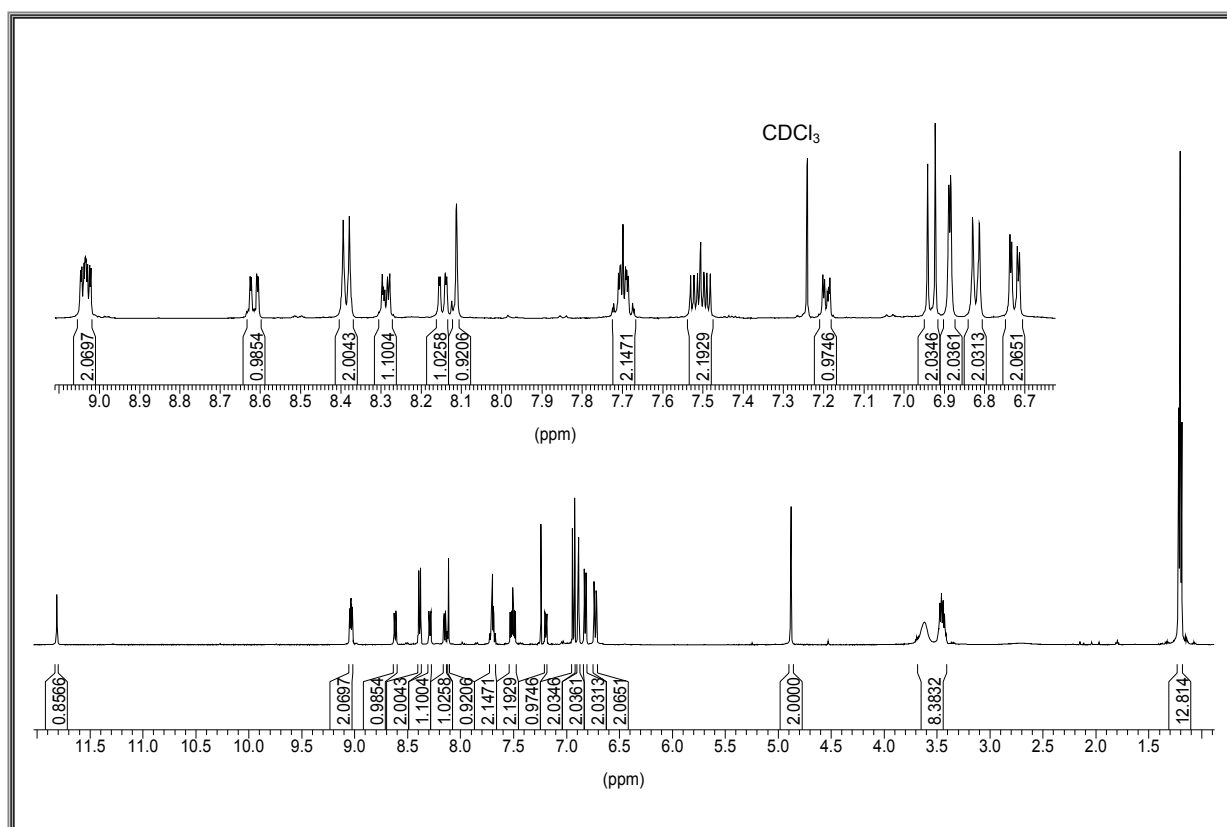


Abbildung 33: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Indikator **11** in CDCl_3

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.57 (1-C), 46.03 (2-C), 67.13 (17-C), 96.94 (5-C), 113.24 (3-C), 113.86 (6-C), 122.30, 122.76 (28-C, 33-C), 123.03 (25-C), 126.35 (24-C), 127.78 (19-C), 128.36, 130.02 (10-C, 15-C), 129.36 (20-C), 129.81 (11-C), 130.26 (12-C), 130.81 (7-C), 131.60 (14-C), 132.75 (13-C), 133.04, 133.05 (26-C, 35-C), 133.49 (34-C), 133.91 (18-C), 135.88 (27-C), 136.93 (21-C), 145.02, 146.32 (29-C, 32-C), 149.31, 149.59 (29-C, 32-C), 155.28 (8-C), 157.34 (4-C), 157.50 (9-C), 165.00 (16-C), 166.78 (22-C).

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3437 (m, $\nu(\text{NH})$), 2976 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aliph}}$), 1715 (m, $\nu(\text{C=O}_{\text{Ester}}$), 1646 (m, $\nu(\text{C=O}_{\text{Amid I}}$), 1589 (s, $\nu(\text{C=O}_{\text{Amid II}}$), 1180 (s, $\nu(\text{C-O}_{\text{Ester}}$)).

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) = 754 (88) [$\text{M}^+ - \text{Br}$], 443 (21) [Rhodamin B Base + H^+].

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet (für $C_{48}H_{44}N_5O_4$): 754.3393

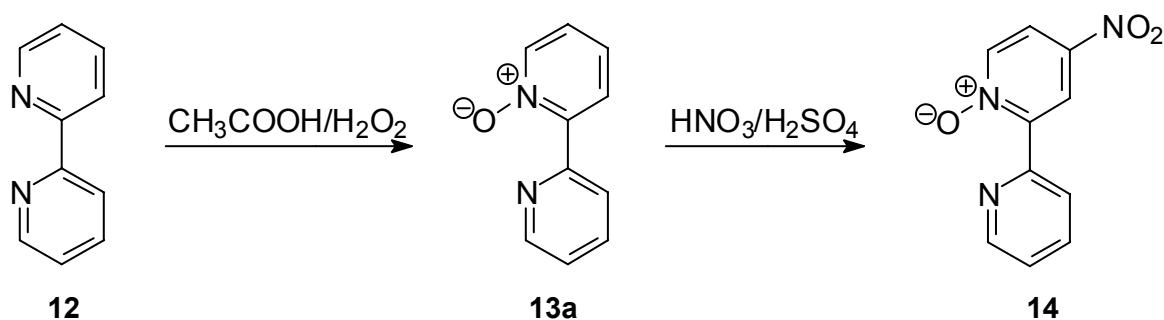
gefunden: 754.3375

Abweichung: 2.4 ppm.

UV-Vis (Chelex-behandelte gepufferte Lösung, 2.00 mM Ascorbinsäure aus frisch zubereiteter Stammlösung, 0.18 % w/v SDS und 10.0 mM Tris/HCl, pH 8.2, 22 °C):

λ_{\max} (lg ϵ) = 563 nm (5.02), 500 - 540 nm (*br sh*).

11.6.8 4-NITRO-2,2'-BIPYRIDIN-1-OXID (**14**)^[118]



Zu einer Lösung von 25.0 g ($M = 156.12$ g/mol, 0.16 mol) 2,2'-Dipyridyl (**12**) in 125 mL Eisessig wurden bei Raumtemperatur und unter Rühren 20.0 mL (0.176 mol) 30proz. Wasserstoffperoxidlösung getropft. Bei einer Temperatur von 70 °C wurde die Mischung 18 Stunden gerührt. Zu der auf Raumtemperatur abgekühlten gelben Reaktionsmischung wurden im Anschluss 4.00 mL Hydrazin Monohydrat gegeben und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, um restliches Wasserstoffperoxid zu zerstören. Die Reaktionslösung wurde daraufhin unter reduziertem Druck von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. 2,2'-Bipyridin-1-oxid (**13a**) wurde als Rohprodukt in Form einer hellgelben viskosen Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Nitrierung eingesetzt.

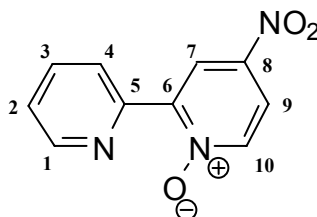
Dazu wurde das viskose Rohprodukt in einem Eis/Viehsalz-Bad auf eine Temperatur von -15 °C abgekühlt und 67.0 mL konzentrierte Schwefelsäure sehr langsam zugetropft. Zu der entstandenen orangefarbenen Suspension wurde unter Kühlung

und unter Rühren ein Gemisch von 100 mL rauchender Salpetersäure und 67.0 mL konzentrierter Schwefelsäure wiederum sehr vorsichtig zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde noch 30 Minuten bei Raumtemperatur und danach zwei Stunden bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung auf 400 g Eis gegossen und gut gerührt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 10.0proz. wässriger Natriumhydroxidlösung auf 5.5 eingestellt. Das anfallende beigefarbene Rohprodukt wurde abfiltriert, getrocknet und zweimal aus je 40.0 mL Chloroform umkristallisiert. 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (**14**) fiel in Form eines hellbeigen Feststoffes an.

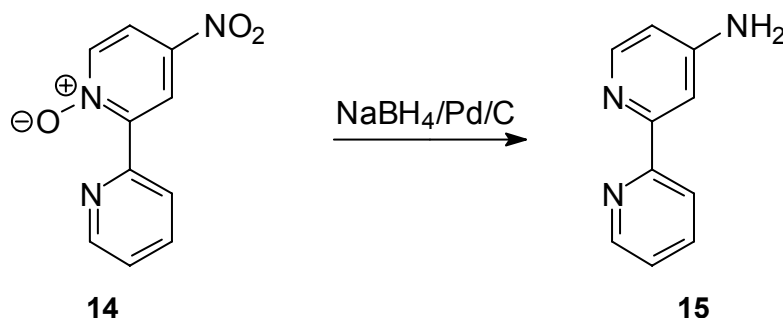
Ausbeute: 5.74 g (26.4 mmol) 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (**14**), 17 %

Schmelzpunkt: 185 °C (Lit.^[118]: 183 - 185 °C)

Charakterisierung:



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.41 (ddd, 1 H, 2-H, ³J{2-H,3-H} = 7.6 Hz, ³J{2-H,1-H} = 4.6 Hz, ⁴J{2-H,4-H} = 1.1 Hz), 7.86 (ddd, 1 H, 3-H, ³J{3-H,4-H} = 8.0 Hz, ³J{3-H,2-H} = 7.9 Hz, ⁴J{3-H,1-H} = 1.8 Hz), 8.04 (dd, 1 H, 9-H, ³J{9-H,10-H} = 7.1 Hz, ⁴J{9-H,7-H} = 3.3 Hz), 8.34 (d, 1 H, 10-H, ³J{10-H,9-H} = 7.1 Hz), 8.77 (ddd, 1 H, 1-H, ³J{1-H,2-H} = 4.7 Hz, ⁴J{1-H,3-H} = 1.9 Hz, ⁵J{-H,-H} = 1.0 Hz), 8.87 (ddd, 1 H, 4-H, ³J{4-H,3-H} = 8.0 Hz, ⁴J{4-H,2-H} = 1.0 Hz, ⁵J{4-H,1-H} = 1.0 Hz), 9.14 (d, 1 H, 7-H, ⁴J{7-H,9-H} = 3.3 Hz).

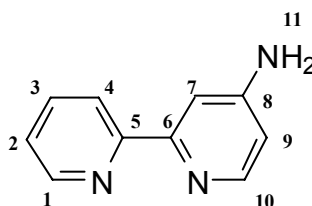
11.6.9 2,2'-BIPYRIDIN-4-AMIN (**15**)^[118]

Zu einer Lösung von 5.50 g ($M = 217.18 \text{ g/mol}$, 25.3 mmol) 4-Nitro-2,2'-bipyridin-1-oxid (**14**) in 1.00 L Methanol wurden im leichten Inertgasstrom 1.15 g Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) gegeben. Nach dem Abkühlen der Suspension im Eisbad auf 0°C wurden unter Rühren portionsweise 10.0 g (264 mmol) Natriumborhydrid zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde im Anschluss drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration der Suspension über 100 g Celite wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in 250 mL Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung fünfmal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das hellgelbe Rohprodukt wurde aus 800 mL Cyclohexan umkristallisiert. 2,2'-Bipyridin-4-amin (**15**) wurde in Form farbloser Nadeln erhalten.

Ausbeute: 3.62 g (23.0 mmol) 2,2'-Bipyridin-4-amin (**15**), 91 %

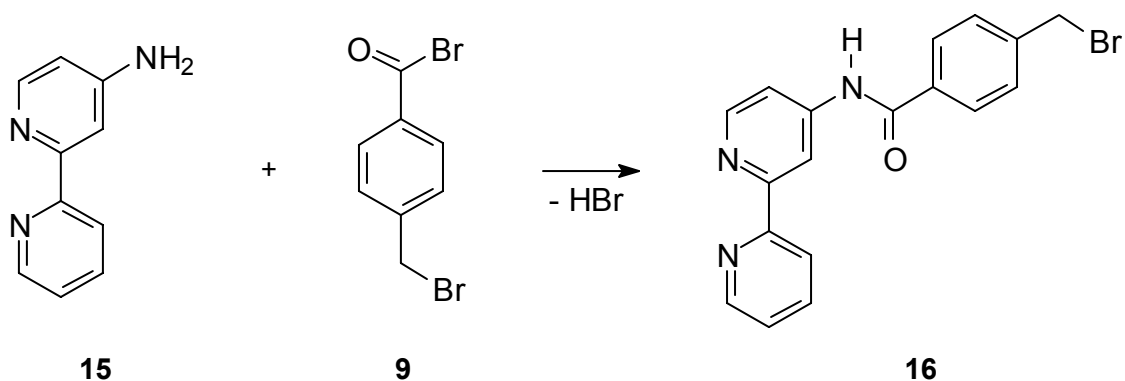
Schmelzpunkt: 126°C (Lit.^[118]: $127 - 129^\circ\text{C}$)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.22 (s, 1 H, 11-H), 6.53 (dd, 1 H, 9-H, $^3J\{9\text{-H},10\text{-H}\} = 5.5$ Hz, $^4J\{9\text{-H},7\text{-H}\} = 2.4$ Hz), 7.26 (ddd, 1 H, 2-H, $^3J\{2\text{-H},3\text{-H}\} = 7.5$ Hz, $^3J\{2\text{-H},1\text{-H}\} = 4.9$ Hz, $^4J\{2\text{-H},4\text{-H}\} = 1.3$ Hz), 7.65 (d, 1 H, 7-H, $^4J\{7\text{-H},9\text{-H}\} = 2.4$ Hz), 7.77 (ddd, 1 H, 3-H, $^3J\{3\text{-H},2\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{3\text{-H},4\text{-H}\} = 7.9$ Hz, $^4J\{3\text{-H},1\text{-H}\} = 1.7$ Hz), 8.29 (d, 1 H, 10-H, $^3J\{10\text{-H},9\text{-H}\} = 5.5$ Hz), 8.33 (ddd, 1 H, 4-H, $^3J\{4\text{-H},3\text{-H}\} = 7.9$ Hz, $^4J\{4\text{-H},2\text{-H}\} = 1.0$ Hz, $^5J\{4\text{-H},1\text{-H}\} = 1.0$ Hz), 8.62 (ddd, 1 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 4.7$ Hz, $^4J\{1\text{-H},3\text{-H}\} = 1.7$ Hz, $^5J\{1\text{-H},4\text{-H}\} = 1.0$ Hz).

11.6.10 *N*-(2,2'-BIPYRIDIN-4-YL)-4-(BROMMETHYL)BENZAMID (**16**)



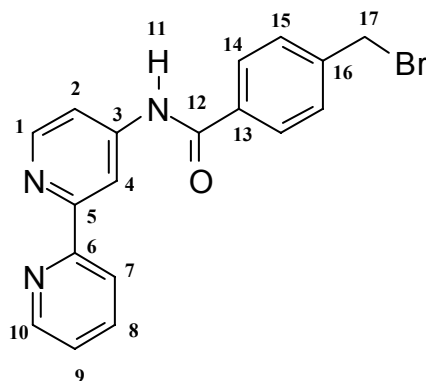
Zur Synthese von *N*-(2,2'-Bipyridin-4-yl)-4-(bromomethyl)benzamid (**16**) wurden 1.33 g ($M = 277.94$ g/mol, 4.77 mmol) 4-Bromomethyl-benzoylbromid (**9**) in 25.0 mL absolutem Acetonitril gelöst und tropfenweise und unter Rühren zu einer Lösung von 0.75 g ($M = 157.19$ g/mol, 4.77 mmol) 2,2'-Bipyridin-4-amin (**15**) in 50.0 mL absolutem Acetonitril gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss der braune Feststoff über eine D4-Glasfritte abfiltriert. Aufeinanderfolgend wurde der Feststoff mit 10.0 mL Acetonitril gewaschen, zweimal mit je 10.0 mL 5.00proz. wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung aufgeschlämmt und abfiltriert sowie zweimal mit je 10.0 mL Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen des erhaltenen Feststoffes (1.26 g) im Exsikkator über Phosphorpentoxid wurde das Rohprodukt portionsweise säulenchromatographisch mit Ethylacetat an basischem Aluminiumoxid gereinigt. (Dazu musste der Feststoff zunächst in Ethylacetat im Ultraschallbad zur Lösung gebracht werden, anschließend wurde die Lösung bis zur Kristallisationsgrenze eingengt und auf die

Säule gegeben.) *N*-(2,2'-Bipyridin-4-yl)-4-(brommethyl)benzamid (**16**) fiel als farbloses Pulver an.

Ausbeute: 420 mg (1.14 mmol) *N*-(2,2'-Bipyridin-4-yl)-4-(brommethyl)benzamid (**16**), 24 %

Zersetzung: > 230 °C

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 4.78 (s, 2 H, 17-H), 7.46 (ddd, 1 H, 9-H, $^3J\{9\text{-H},8\text{-H}\} = 7.3$ Hz, $^3J\{9\text{-H},10\text{-H}\} = 4.7$ Hz, $^4J\{9\text{-H},7\text{-H}\} = 1.0$ Hz), 7.62 (d, 2 H, 15-H, $^3J\{15\text{-H},14\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 7.92 - 7.94 (m, 2 H, 2-H, 8-H), 8.00 (d, 2 H, 14-H, $^3J\{14\text{-H},15\text{-H}\} = 8.1$ Hz), 8.39 (dm, 1 H, 7-H, $^3J\{7\text{-H},8\text{-H}\} = 8.0$ Hz), 8.59 (d, 1 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 5.5$ Hz), 8.69 (ddd, 1 H, 10-H, $^3J\{10\text{-H},9\text{-H}\} = 4.7$ Hz, $^4J\{10\text{-H},8\text{-H}\} = 1.6$ Hz, $^4J\{10\text{-H},7\text{-H}\} = 0.8$ Hz), 8.85 (d, 1 H, 4-H, $^4J\{4\text{-H},2\text{-H}\} = 2.0$ Hz), 10.75 (s, 1 H, 11-H).

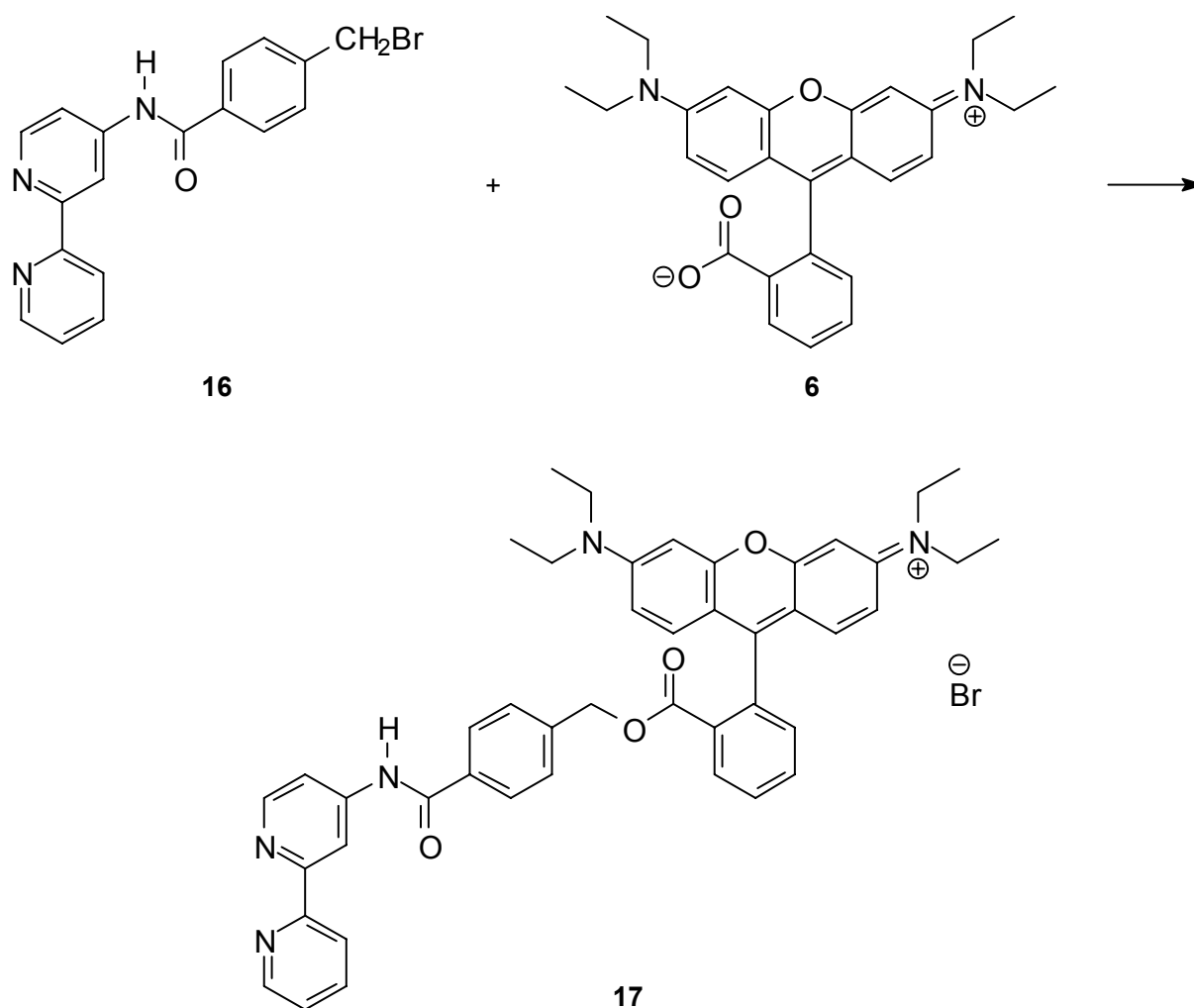
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 33.31 (17-C), 110.87, 114.17, 120.52, 124.31, 128.32 (14-C), 128.86, 129.34 (15-C), 131.95, 133.82, 137.31, 142.16, 149.19, 149.91, 165.94 (12-C).

(Die Zuordnung einzelner C-Atome musste aufgrund zunehmender Zersetzung bei längerer Verweilzeit des Produktes in Dimethylsulfoxid und der damit verbundenen Unzugänglichkeit zweidimensionaler Spektren entfallen.)

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3437 (m, $\nu(\text{NH})$), 3028, 3075 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$), 2985 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aliph}}$), 1681 (s, $\nu(\text{CO}_{\text{Amid I}})$), 1589 (s, $\nu(\text{CO}_{\text{Amid II}})$), 1518 (s, $\delta(\text{NH}_{\text{Amid}})$).

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) 368 (100) [M^+], 289 (61) [$\text{M}^+ - \text{Br}$].

11.6.11 RHODAMIN B-4-[(2,2'-BIPYRIDIN-4-YL)AMINOCARBONYL]BENZYLESTER (**17**)



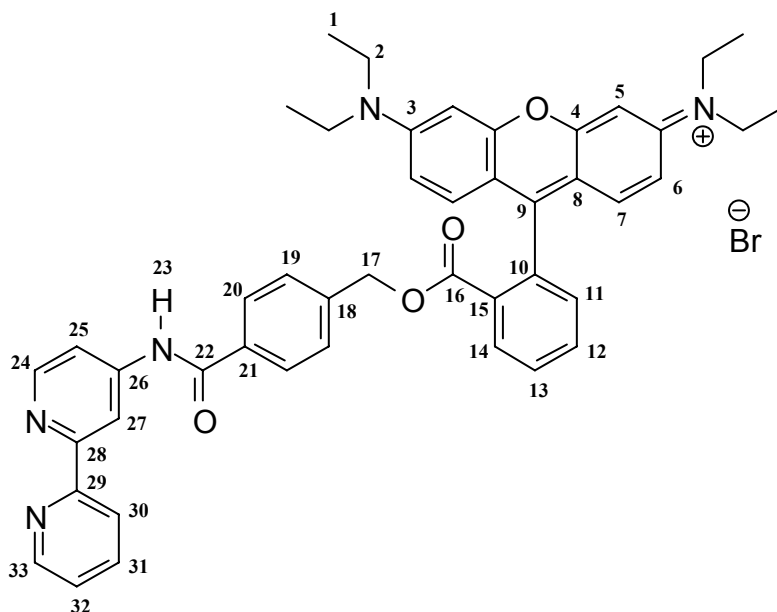
Eine Lösung von 120 mg ($M = 442.55 \text{ g/mol}$, 0.27 mmol) Rhodamin B Base (**6**) und 100 mg ($M = 368.23 \text{ g/mol}$, 0.27 mmol) *N*-(2,2'-Bipyridin-4-yl)-4-(bromomethyl)benzamid (**16**) in 5.00 mL absolutem Dimethylformamid wurde über einen Zeitraum von 30 Stunden bei einer Temperatur von 90 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im

Ölpumpenvakuum bei einer Badtemperatur $< 70^{\circ}\text{C}$ vollständig abkondensiert. Der dunkellila gefärbte Rückstand wurde in 15.0 mL warmem Dichlormethan aufgenommen, unlösliche Bestandteile abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an deaktiviertem neutralem Aluminiumoxid mit dem Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/n-Hexan/Ethanol (1. 10:4:1 und 2. 10:2:1, v/v/v) gereinigt. Die vereinigten Produktfraktionen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) wurde in Form eines dunkelroten Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 120 mg (0.15 mmol) Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**), 54 %

Schmelzbereich: $165 - 167^{\circ}\text{C}$

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 1.26 (t, 12 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 7.2$ Hz), 3.41 - 3.62 (m, 8 H, 2-H), 4.88 (s, 2 H, 17-H), 6.77 (dd, 2 H, 6-H, $^3J\{6\text{-H},7\text{-H}\} = 9.5$ Hz, $^4J\{6\text{-H},5\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 6.82 (d, 2 H, 5-H, $^4J\{5\text{-H},6\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 6.86 (d, 2 H, 19-H, $^3J\{19\text{-H},20\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 6.97 (d, 2 H, 7-H, $^3J\{7\text{-H},6\text{-H}\} = 9.4$ Hz), 7.24 - 7.25 (m, 1 H, 11-H), 7.30 (dd, 1 H, 32-H, $^3J\{32\text{-H},31\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{32\text{-H},33\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{32\text{-H},31\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.31 (dd, 1 H, 31-H, $^3J\{31\text{-H},32\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{31\text{-H},30\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{31\text{-H},32\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.32 (dd, 1 H, 30-H, $^3J\{30\text{-H},31\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{30\text{-H},29\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{30\text{-H},29\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.33 (dd, 1 H, 29-H, $^3J\{29\text{-H},30\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{29\text{-H},28\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{29\text{-H},28\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.34 (dd, 1 H, 28-H, $^3J\{28\text{-H},29\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{28\text{-H},27\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{28\text{-H},27\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.35 (dd, 1 H, 27-H, $^3J\{27\text{-H},28\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{27\text{-H},26\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{27\text{-H},26\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.36 (dd, 1 H, 26-H, $^3J\{26\text{-H},27\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{26\text{-H},25\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{26\text{-H},25\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.37 (dd, 1 H, 25-H, $^3J\{25\text{-H},26\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{25\text{-H},24\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{25\text{-H},24\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.38 (dd, 1 H, 24-H, $^3J\{24\text{-H},25\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{24\text{-H},23\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{24\text{-H},23\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.39 (dd, 1 H, 23-H, $^3J\{23\text{-H},24\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{23\text{-H},22\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{23\text{-H},22\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.40 (dd, 1 H, 22-H, $^3J\{22\text{-H},23\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{22\text{-H},21\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{22\text{-H},21\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.41 (dd, 1 H, 21-H, $^3J\{21\text{-H},22\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{21\text{-H},20\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{21\text{-H},20\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.42 (dd, 1 H, 20-H, $^3J\{20\text{-H},21\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{20\text{-H},19\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{20\text{-H},19\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.43 (dd, 1 H, 19-H, $^3J\{19\text{-H},20\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{19\text{-H},18\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{19\text{-H},18\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.44 (dd, 1 H, 18-H, $^3J\{18\text{-H},19\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{18\text{-H},17\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{18\text{-H},17\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.45 (dd, 1 H, 17-H, $^3J\{17\text{-H},18\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{17\text{-H},16\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{17\text{-H},16\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.46 (dd, 1 H, 16-H, $^3J\{16\text{-H},17\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{16\text{-H},15\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{16\text{-H},15\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.47 (dd, 1 H, 15-H, $^3J\{15\text{-H},16\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{15\text{-H},14\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{15\text{-H},14\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.48 (dd, 1 H, 14-H, $^3J\{14\text{-H},15\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{14\text{-H},13\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{14\text{-H},13\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.49 (dd, 1 H, 13-H, $^3J\{13\text{-H},14\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{13\text{-H},12\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{13\text{-H},12\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.50 (dd, 1 H, 12-H, $^3J\{12\text{-H},13\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{12\text{-H},11\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{12\text{-H},11\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.51 (dd, 1 H, 11-H, $^3J\{11\text{-H},12\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{11\text{-H},10\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{11\text{-H},10\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.52 (dd, 1 H, 10-H, $^3J\{10\text{-H},11\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{10\text{-H},9\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{10\text{-H},9\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.53 (dd, 1 H, 9-H, $^3J\{9\text{-H},10\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{9\text{-H},8\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{9\text{-H},8\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.54 (dd, 1 H, 8-H, $^3J\{8\text{-H},9\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{8\text{-H},7\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{8\text{-H},7\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.55 (dd, 1 H, 7-H, $^3J\{7\text{-H},8\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{7\text{-H},6\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{7\text{-H},6\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.56 (dd, 1 H, 6-H, $^3J\{6\text{-H},7\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{6\text{-H},5\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{6\text{-H},5\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.57 (dd, 1 H, 5-H, $^3J\{5\text{-H},6\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{5\text{-H},4\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{5\text{-H},4\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.58 (dd, 1 H, 4-H, $^3J\{4\text{-H},5\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{4\text{-H},3\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{4\text{-H},3\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.59 (dd, 1 H, 3-H, $^3J\{3\text{-H},4\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{3\text{-H},2\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{3\text{-H},2\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.60 (dd, 1 H, 2-H, $^3J\{2\text{-H},3\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{2\text{-H},1\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{2\text{-H},1\text{-H}\} = 2.5$ Hz), 7.61 (dd, 1 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 7.4$ Hz, $^3J\{1\text{-H},0\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J\{1\text{-H},0\text{-H}\} = 2.5$ Hz).

H,30-H} = 1.2 Hz), 7.73 - 7.78 (m, 2 H, 12-H, 13-H), 7.81 (ddd, 1 H, 31-H, $^3J\{31\text{-H},32\text{-H}\} = 7.6$ Hz, $^3J\{31\text{-H},30\text{-H}\} = 7.5$ Hz, $^4J\{31\text{-H},33\text{-H}\} = 1.9$ Hz), 8.32 - 8.36 (m, 4 H, 12-H, 13-H, 20-H, 25-H, $^3J\{20\text{-H},19\text{-H}\} = 8.4$ Hz), 8.42 (m, 1 H, 30-H, $^3J\{30\text{-H},31\text{-H}\} = 7.9$ Hz), 8.52 (d, 1 H, 24-H, $^3J\{24\text{-H},25\text{-H}\} = 5.4$ Hz), 8.70 (ddd, 1 H, 33-H, $^3J\{33\text{-H},32\text{-H}\} = 4.7$ Hz, $^4J\{33\text{-H},31\text{-H}\} = 1.9$ Hz, $^5J\{33\text{-H},30\text{-H}\} = 0.9$ Hz), 9.27 (d, 1 H, 27-H, $^4J\{27\text{-H},25\text{-H}\} = 2.0$ Hz), 11.66 (s, 1 H, 23-H).

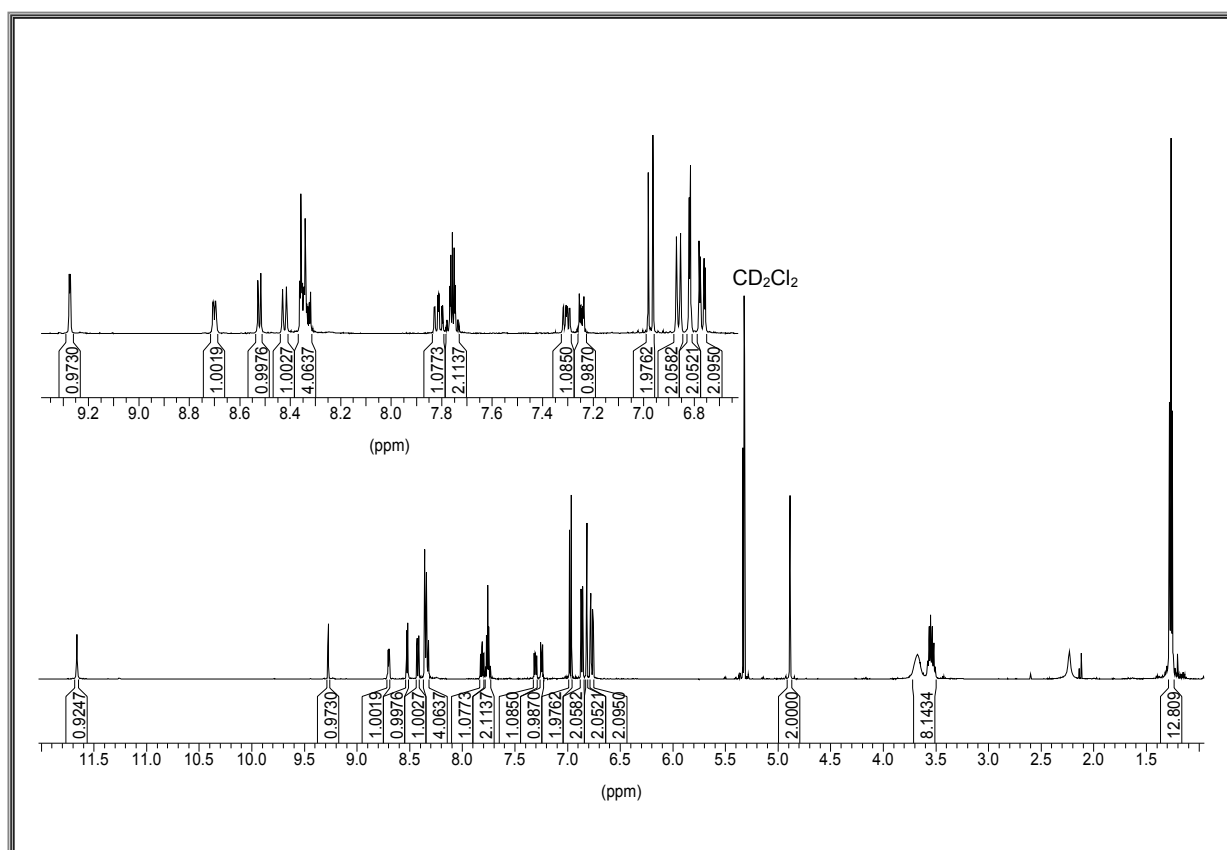


Abbildung 34: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Indikator **17** in CD_2Cl_2

^{13}C -NMR (125 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 12.37 (1-C), 46.07 (2-C), 67.03 (17-C), 96.70 (5-C), 112.14 (27-C), 113.31 (4-C), 113.91 (6-C), 115.60 (25-C), 120.93 (30-C), 123.39 (32-C), 127.80 (19-C), 129.32 (20-C), 129.94 (14-C), 130.20 (12-C), 130.24, 132.69, 157.62 (9-C, 10-C, 15-C), 130.86 (7-C), 131.47 (11-C), 133.09 (13-C), 134.25 (21-C), 136.61 (31-C), 137.34 (18-C), 147.99 (26-C), 149.07 (33-C), 149.50 (24-C), 155.43 (3-C), 156.46 (28-C), 156.65 (29-C), 157.40 (8-C), 165.07 (16-C), 166.32 (22-C).

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3400 (m, $\nu(\text{NH})$), 2978 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aliph}}$), 1719 (m, $\nu(\text{C=O}_{\text{Ester}})$), 1647 (m, $\nu(\text{C=O}_{\text{Amid I}})$), 1589 (s, $\nu(\text{C=O}_{\text{Amid II}})$), 1181 (s, $\nu(\text{C-O}_{\text{Ester}})$).

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) = 730 (100) [$\text{M}^+ - \text{Br}$], 443 (13) [Rhodamin B Base + H^+].

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet (für $\text{C}_{46}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_4$): 730.3393

gefunden: 730.3391

Abweichung: 0.3 ppm.

Elementaranalyse:

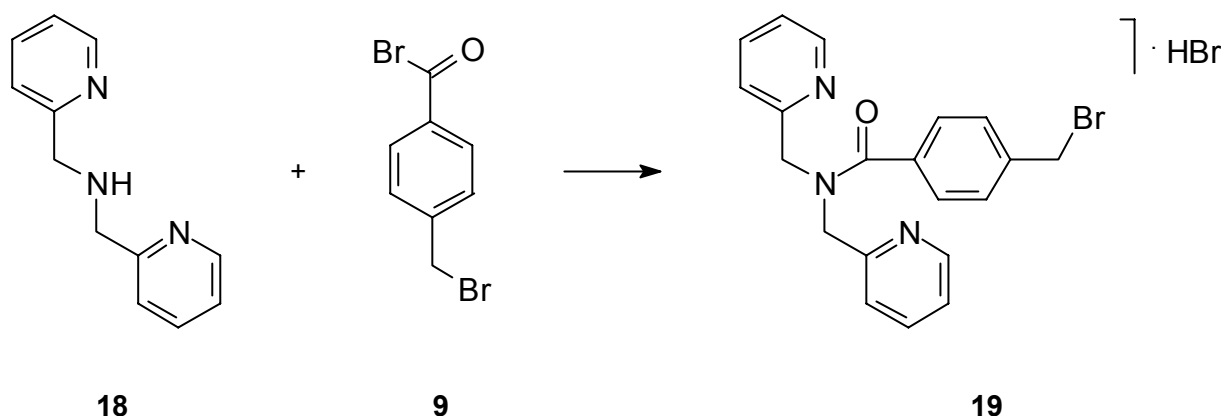
berechnet (für $\text{C}_{46}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_4\text{Br}$): C 68.14 H 5.47 N 8.64

gefunden: C 68.32 H 5.66 N 8.82.

UV-Vis (Chelex-behandelte gepufferte Lösung, 2.00 mM Ascorbinsäure aus frisch zubereiteter Stammlösung, 0.18 % w/v SDS und 10.0 mM Tris/HCl, pH 8.2, 22 °C):

λ_{max} ($\lg \varepsilon$) = 562 nm (4.99), 500 - 535 nm (*br sh*).

11.6.12 4-(BROMMETHYL)-*N,N*-BIS(PYRIDIN-2-YL-METHYL)BENZAMID HYDROBROMID(**19**)



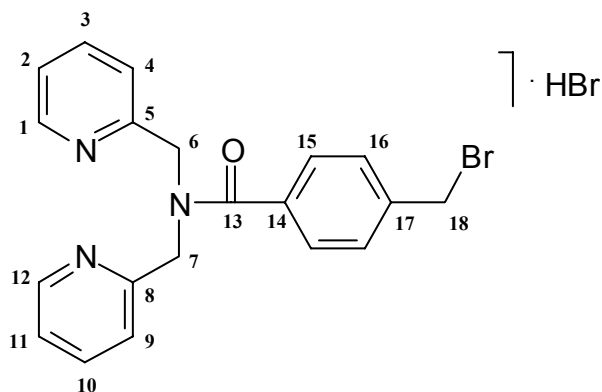
Zu einer eisgekühlten Lösung von 1.33 mL ($M = 199.25$ g/mol, 1.48 g, 7.41 mmol) *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**) in 20.0 mL absolutem Tetrahydrofuran wurde unter Inertgasatmosphäre über einen Zeitraum von 30 Minuten eine Lösung von 2.06 g (7.41 mmol) 4-Bromomethyl-benzoylbromid (**9**) in 20.0 mL absolutem Tetra-

hydrofuran zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch eine Stunde bei 0 °C gerührt. Der anfallende feinpulvrige, farblose Feststoff wurde in der Kälte abfiltriert, mit 10.0 mL kaltem Tetrahydrofuran gewaschen und im Ölpumpenvakuum von Lösungsmittelresten befreit.

Ausbeute: 2.65 g (5.55 mmol), 4-(Brommethyl)-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid Hydrobromid (**19**), 75 %

Zersetzung: > 160 °C

Charakterisierung:



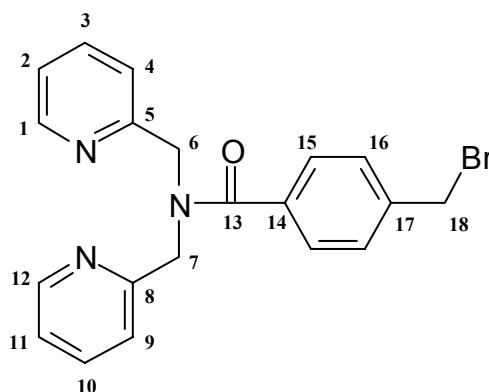
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , pH-Wert = 2 - 3): δ [ppm] = 4.52 (s, 2 H, 18-H), 5.00, 5.12 (2 s, je 2 H, 6-H, 7-H), 7.24 (d, 1 H, 9-H o. 4-H, $^3J = 7.9$ Hz), 7.27 (d, 2 H, 16-H, $^3J\{16\text{-H}, 15\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 7.38 (d, 2 H, 15-H, $^3J\{15\text{-H}, 16\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 7.55 (m, 1 H, 11-H o. 2-H), 7.83 (m, 1 H, 10-H o. 3-H), 7.88 (d, 1 H, 4-H o. 9-H, $^3J = 8.0$ Hz), 7.95 (m, 1 H, 2-H o. 11-H), 8.38 (m, 1 H, 3-H o. 10-H), 8.66 (d, 1 H, 1-H o. 12-H, $^3J = 4.9$ Hz), 8.79 (d, 1 H, 1-H o. 12-H, $^3J = 5.4$ Hz).

(Aufgrund von verbreiterten Signalen war die Auswertung der Fernkopplungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht möglich. Sowohl die Verbreiterung der Signale als auch die unerwartete Vielzahl der im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum erkennbaren C-Atome ließen auf eine Zersetzung des Produktes bzw. die Anwesenheit verschieden protonierter Produktspezies bei längerer Messzeit schließen. Die Auswertung des $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrums musste daher entfallen.)

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) = 396 (100) [$M^+ - HBr$], 317 (13) [$M^+ - HBr_2$], 198 (43) [$C_{12}H_{12}N_3^+$].

NMR-spektroskopische Untersuchung des Feststoffes bei Basenzugabe (NaOD):

Dazu wurden zunächst 19.0 mg (40.0 μ mol) des Hydrobromids **19** in 700 μ L D_2O gelöst und 20.0 μ L einer 4.00 M NaOD-Lösung in D_2O (80.0 μ mol) unter Inertgasatmosphäre hinzugegeben. Die Spektrenaufnahme erfolgte direkt im Anschluss.



19a

1H -NMR (500 MHz, $D_2O/NaOD$, pH-Wert = 7 - 8): δ [ppm] = 4.57 (s, 2 H, 18-H), 4.65, 4.80 (2 s, je 2 H, 6-H, 7-H), 7.13 (d, 1 H, 9-H o. 4-H, $^3J = 7.9$ Hz), 7.26 (dd, 1 H, 2-H o. 11-H, $^3J = 6.8$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz), 7.29 - 7.34 (m, 4 H, 4-H o. 9-H, 2-H o. 11-H, 16-H, $^3J\{15-H, 16-H\} = 8.2$ Hz), 7.70 (ddd, 1 H, 3-H o. 10-H, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz), 7.80 (ddd, 1 H, 3-H o. 10-H, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz), 8.34, 8.38 (2 d, je 1 H, 1-H, 12-H, $^3J = 5.0$ Hz, $^3J = 4.7$ Hz).

^{13}C -NMR (125 MHz, $D_2O/NaOD$, pH-Wert = 7 - 8): δ [ppm] = 53.62 (18-C), 57.61, 66.00 (6-C, 7-C), 125.36 (2-C, 11-C), 126.04, 126.11 (4-C, 9-C), 129.47, 130.10 (15-C, 16-C), 136.20, 141.12 (14-C, 17-C), 141.20, 145.51 (3-C, 10-C), 150.92, 151.26 (1-C, 12-C), 157.42, 157.63 (5-C, 8-C), 177.47 (13-C).

(Die Protonen und Kohlenstoffatome der beiden Pyridinringe sind aufgrund einer eingeschränkten Rotation um die Amidbindung nicht chemisch äquivalent.)

11.6.13 4-(BROMMETHYL)-*N,N*-BIS(PYRIDIN-2-YL-METHYL)BENZAMID (**19A**)

Die Isolierung von 4-(Brommethyl)-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid (**19a**) wurde zunächst durch vorsichtige Basenzugabe zur wässrigen Lösung des Hydrobromids **19** angestrebt. Dazu wurde zu einer Lösung von 500 mg ($M = 477.20$ g/mol, 1.05 mmol) Hydrobromid **19** in 5.00 mL Wasser (pH = 3) tropfenweise eine 5.00proz. wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben, bis ein pH-Wert von 7.8 erreicht war. Während der Zugabe schied sich ein farbloses Öl aus der wässrigen Lösung ab. Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes wurde keine Zunahme der Ölmenge erreicht. Die wässrige Phase wurde abdekantiert und das Öl in Diethylether aufgenommen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Es wurden 30.0 mg eines farblosen Öls erhalten, das nach 15 Stunden glasartig erstarrte.

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des farblosen Feststoffes in DMSO- d_6 konnten aufgrund der Vielzahl von Signalen, die auf diverse Produktspezies hinwiesen, nicht ausgewertet werden.

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) = 396 (10) [$\text{M}^+ - \text{HBr}$], 316 (42) [$\text{M}^+ - \text{HBr}_2$], 198 (100) [$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3$] $^+$.

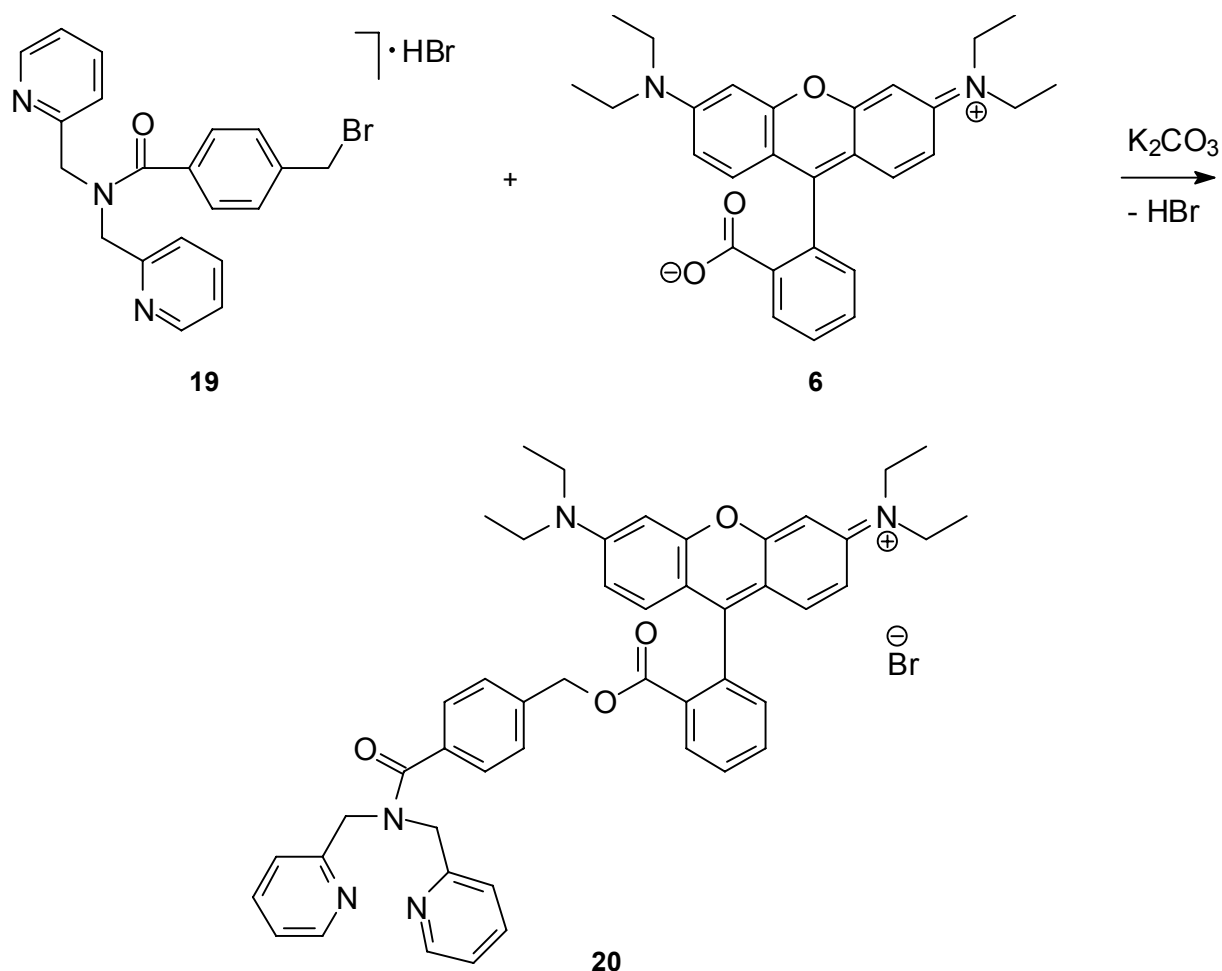
Eine weitere Synthesemöglichkeit bestand in der direkten Basenzugabe während der Reaktion. Dazu wurden einer eisgekühlten Lösung von 1.80 mL (1.99 g, 10.0 mmol) *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**) und 1.46 mL (1.06 g, 10.5 mmol) Triethylamin in 50.0 mL absolutem Tetrahydrofuran tropfenweise und unter Inertgasatmosphäre über einen Zeitraum von 20 Minuten 2.92 g (10.5 mmol) 4-Brommethyl-benzoesäurebromid (**9**) in 20.0 mL absolutem Tetrahydrofuran zugefügt. Nach beendeter Zugabe wurde noch 20 Minuten bei 0 °C gerührt. Das als farbloser, pulveriger Feststoff anfallende Triethylamin Hydrobromid (1.95 g, 100 %) wurde abfiltriert. Das gelbe Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und im Ölpumpenvakuum von Lösungsmittelresten befreit, wobei 4.03 g eines gelbgrünen Pulvers erhalten wurden.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6): keine Zuordnung möglich

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) = 396 (9) $[\text{M}^+]$, 316 (35) $[\text{M}^+ - \text{Br}]$, 198 (100) $[\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3^+]$.

Eine Isolierung der Verbindung **19a** war auch in diesem Fall nicht möglich; Reinigungsversuche durch Säulenchromatographie, Umkristallisation oder präparative Dünnschichtchromatographie schlugen fehl.

11.6.14 RHODAMIN B-4-[BIS(PYRIDIN-2-YL-METHYL)AMINOCARBONYL]BENZYLESTER (**20**)

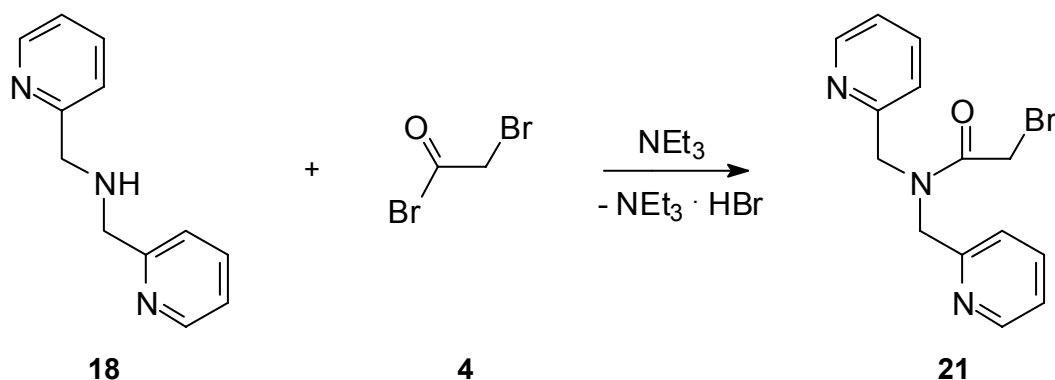


Einer Lösung von 95.4 mg ($M = 477.20$ g/mol, 0.20 mmol) 4-(Bromomethyl)-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)benzamid Hydrobromid (**19**) in 5.00 mL absolutem Dimethylformamid wurden unter Rühren 82.9 mg (0.60 mmol) Kaliumcarbonat und 88.5 mg ($M = 442.55$ g/mol, 0.20 mmol) Rhodamin B Base (**6**) zugefügt. Die Reaktions-

mischung wurde bei einer Temperatur von 60 °C und bei 100 °C über einen Zeitraum von jeweils drei Tagen gerührt. Anhand dünnschichtchromatographischer und NMR-spektroskopischer Untersuchungen war bereits nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden keine Veränderung der Reaktionslösung mehr zu erkennen. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum bei einer Badtemperatur < 70°C vollständig abkondensiert. Der dunkellila gefärbte Rückstand wurde in 15.0 mL warmem Dichlormethan aufgenommen, unlösliche Bestandteile abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das erhaltene Feststoffgemisch wurde säulenchromatographisch an deaktiviertem neutralem Aluminiumoxid unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches Dichlormethan/n-Hexan/Ethanol (1. 10:4:1 und 2. 10:2:1 v/v/v) getrennt. Es wurden vier fluoreszierende Produktfraktionen erhalten. Diese wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und die erhaltenen Feststoffe im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die NMR-spektroskopische sowie massenspektrometrische Untersuchung der Feststoffe ließ in keinem Fall eine isolierbare Menge an Rhodamin B-4-[bis(pyridin-2-yl-methyl)aminocarbonyl]benzylester (**20**) erkennen.

Die Durchführung der Reaktion bei erhöhter Temperatur von 100 °C führte zu ähnlichen Ergebnissen.

11.6.15 2-BROM-*N,N*-BIS(PYRIDIN-2-YL-METHYL)ACETAMID (**21**)

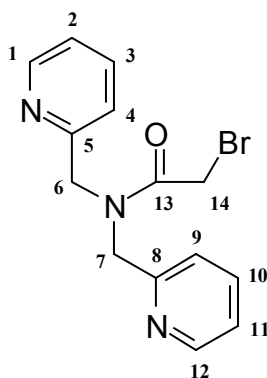


Zu einer eisgekühlten Lösung von 1.80 mL (1.99 g, 10.0 mmol) *N,N*-Bis(pyridin-2-yl-methyl)amin (**18**) und 1.46 mL (1.06 g, 10.5 mmol) Triethylamin in 50.0 mL absolutem Tetrahydrofuran wurde unter Schutzgasatmosphäre über einen Zeitraum

von 20 Minuten eine Lösung von 0.92 mL (2.11 g, 10.5 mmol) Bromacetyl bromid (**4**) in 10.0 mL absolutem Tetrahydrofuran zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde noch 20 Minuten bei 0 °C gerührt. Das entstandene Triethylamin Hydrobromid wurde in der Kälte abfiltriert, das braune Filtrat am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 30 °C bis zur Trockne eingengt und im Ölpumpenvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Das Rohprodukt fiel als braunes Öl an. 2-Brom-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)acetamid (**21**) konnte nach Reinigung durch Flash-Chromatographie an neutralem Aluminiumoxid unter Verwendung von Ethanol in Form eines hellbraunen Öls erhalten werden.

Ausbeute: 550 mg (1.72 mmol) 2-Brom-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)acetamid (**21**),
17 %

Charakterisierung:

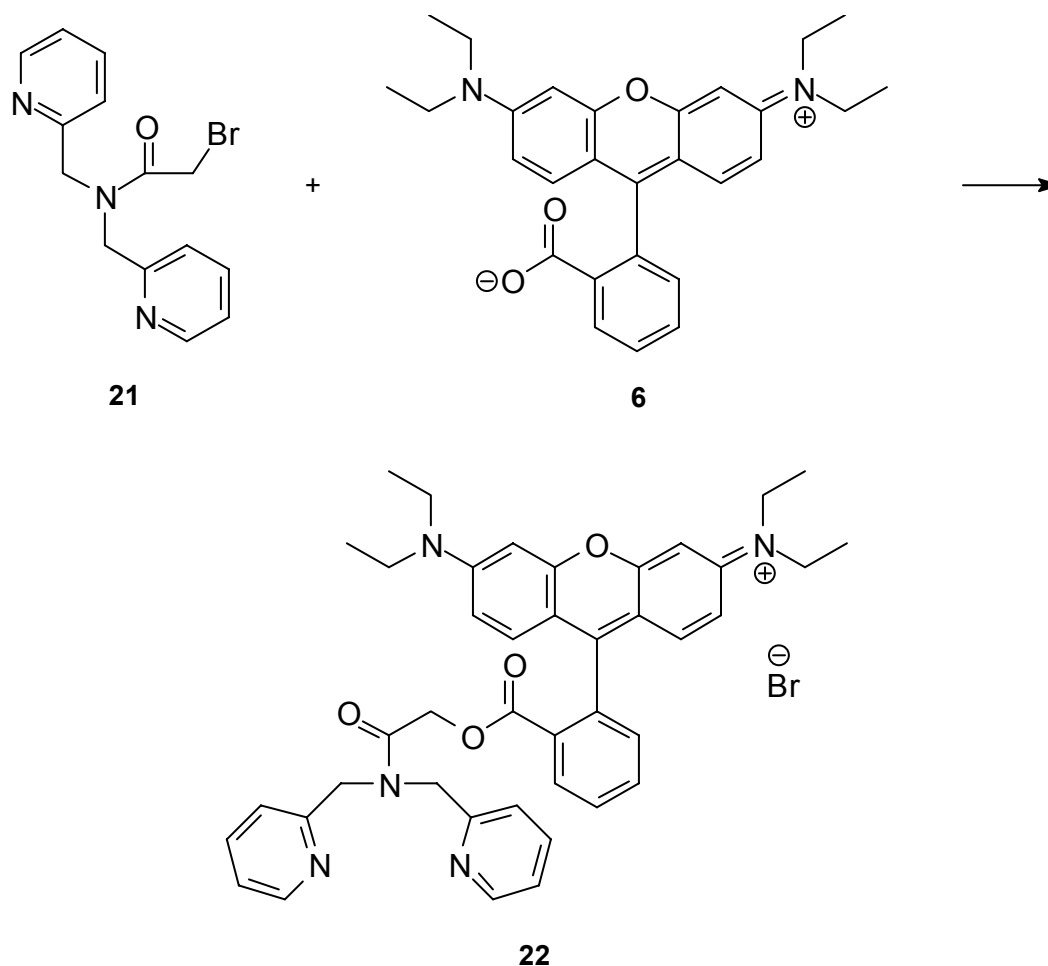


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 4.81 (s, 2 H, 14-H), 5.13, 5.43 (2 s, je 2 H, 6-H, 7-H), 7.33 (ddd, 1 H, 2-H o. 11-H, $^3J\{2\text{-H},3\text{-H}\}$ o. $^3J\{11\text{-H},10\text{-H}\} = 7.6$ Hz, $^3J\{2\text{-H},1\text{-H}\}$ o. $^3J\{11\text{-H},12\text{-H}\} = 4.8$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz), 7.40 (d, 1 H, 4-H o. 9 H, $^3J = 7.8$ Hz), 7.81 (ddd, 1 H, 3-H o. 10-H, $^3J = ^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz), 8.10 - 8.14 (m, 2 H, 4-H o. 9-H, 3-H o. 10-H), 8.50 (ddd, 1 H, 1-H o. 12-H, $^3J = 4.8$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, $^5J = 0.9$ Hz), 8.61 (ddd, 1 H, 2-H o. 11-H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz), 9.01 (dm, 1 H, 1-H o. 12-H, $^3J = 5.5$ Hz).

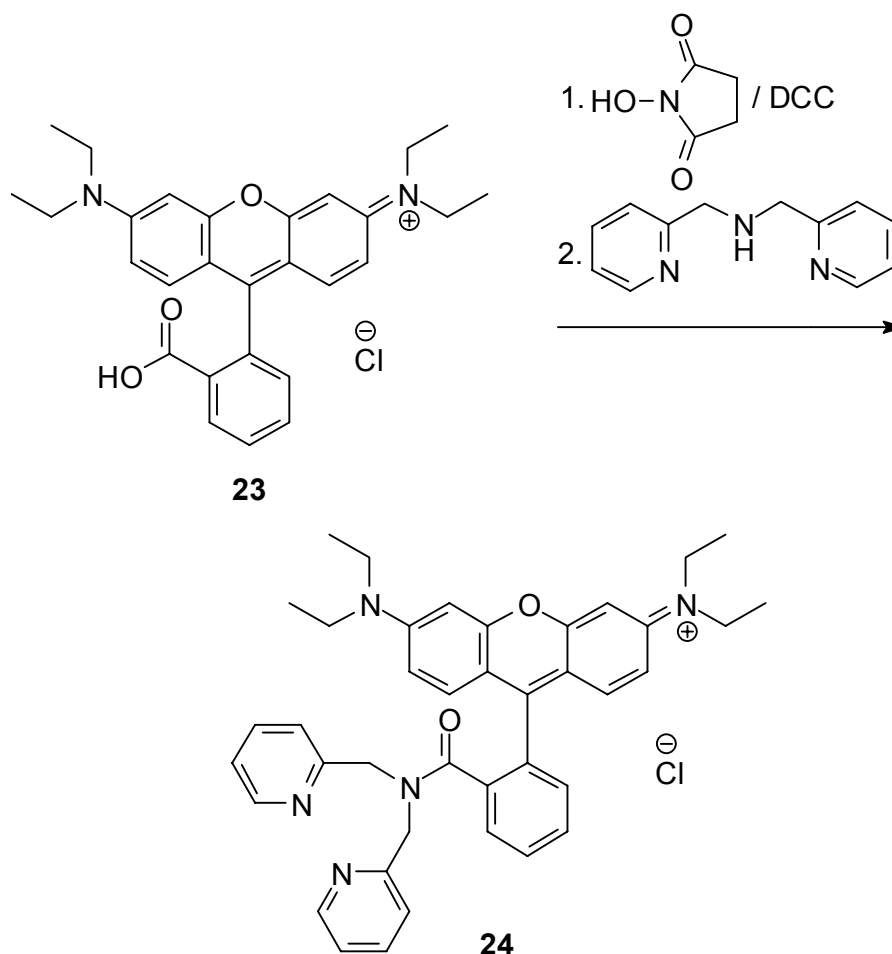
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 48.50, 50.19, 57.03 (14-C, 6-C, 7-C), 121.96, 122.78 (2-C, 11-C), 125.71, 126.29 (4-C, 9-C), 137.20, 144.04 (2-C, 11-C), 145.72, 149.03 (1-C, 12-C), 149.09, 155.34 (5-C, 8-C), 162.27 (13-C).

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) = 240 (100) [$M^+ - Br$], 198 (4) [$C_{12}H_{13}N_3^+$].

11.6.16 RHODAMIN B-[(BIS(PYRIDIN-2-YL-METHYL)AMINOCARBONYL)METHYLESTER] (22)



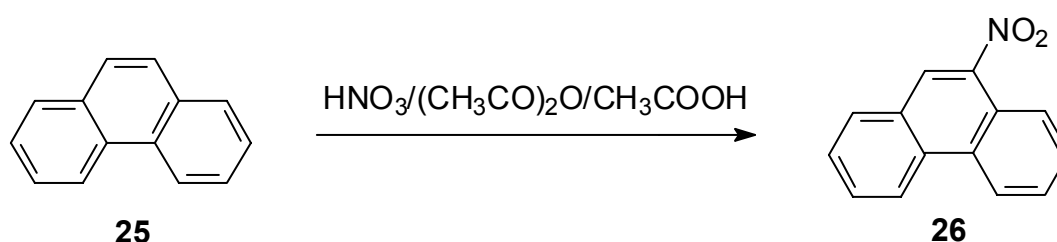
In 2.00 mL absolutem Dimethylformamid wurden 58.0 mg ($M = 442.55$ g/mol, 0.13 mmol) Rhodamin B Base (**6**) und 42.0 mg ($M = 320.19$ g/mol, 0.13 mmol) 2-Brom-*N,N*-bis(pyridin-2-yl-methyl)acetamid (**21**) gelöst und über einen Zeitraum von 40 Stunden bei einer Temperatur von 90 °C gerührt. Da mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle (neutrales Aluminiumoxid, Dichlormethan/Ethanol = 8 : 1 v/v) auch nach dieser Reaktionszeit eine fluoreszierende Produktspezies nicht zu beobachten war, wurde die Reaktion an diesem Punkt abgebrochen. Auch die Untersuchung des nach vollständigem Entfernen des Lösungsmittels erhaltenen Feststoffgemisches ließ lediglich die Identifizierung der Edukte zu.

11.6.17 RHODAMIN B-[*N,N*-BIS(PYRIDIN-2-YL-METHYL)]AMID (**24**)

Zu einer Lösung von 1.00 g ($M = 479.02 \text{ g/mol}$, 2.09 mmol) Rhodamin B Hydrochlorid (**23**) und 313 mg ($M = 115.09 \text{ g/mol}$, 2.72 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 20.0 mL absolutem 1,4-Dioxan wurden unter Schutzgasatmosphäre und unter Rühren portionsweise 561 mg ($M = 206.33 \text{ g/mol}$, 2.72 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugefügt. Die Lösung wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der entstandene Dicyclohexylharnstoff im Anschluss über eine D2-Glasfritte abfiltriert. Da die Menge des nach Trocknung als pulveriger Feststoff anfallenden Harnstoffes einem quantitativen Umsatz entsprach, konnte das den Succinimidylester des Rhodamin B enthaltende Filtrat ohne Aufarbeitung für die nachfolgende Amidsynthese eingesetzt werden.

Zum den Succinimidylester enthaltenden Filtrat aus vorangegangener Synthese wurde eine Lösung von 416 mg ($M = 199.25 \text{ g/mol}$, 2.09 mmol) *N,N*-Bis(pyridin-2-ylmethyl)amin (**18**) in 2.00 mL Dimethylformamid tropfenweise zugegeben und die entstehende Reaktionslösung bis zu fünf Tagen bei Raumtemperatur gerührt. Weder dünnschichtchromatographisch noch NMR-spektroskopisch konnte nach Probenahme die Entstehung einer fluoreszierenden Produktspezies **24** beobachtet werden.

11.6.18 9-NITROPHENANTHREN (**26**)^[133]

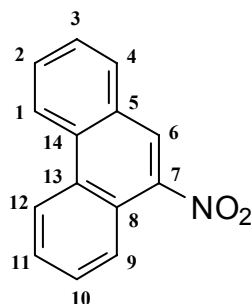


Zu 12.0 mL Essigsäureanhydrid wurden tropfenweise unter Rühren 6.00 mL Salpetersäure zugefügt. Die resultierende Lösung wurde so langsam zu einer Lösung von 8.00 g ($M = 178.23 \text{ g/mol}$, 44.9 mmol) Phenanthren (**25**) in 16.0 mL Eisessig getropft, dass die Reaktion unter Kontrolle gehalten werden konnte. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung über einen Zeitraum von zwei Stunden bei 100 °C gerührt und nach dem Abkühlen auf 500 mL Eiswasser gegeben. Die wässrige Phase wurde abdekantiert und der gelbe Rückstand in 75.0 mL Chloroform gelöst. Die Wasserphase wurde mit 50.0 mL Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden aufeinanderfolgend mit 25.0 mL Wasser, 25.0 mL 5.00proz. wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und 25.0 mL Wasser gewaschen. Die organische Lösung wurde danach über Natriumsulfat getrocknet und im Anschluss am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde im Ultraschallbad in 4.00 mL Toluol gelöst und säulenchromatographisch (neutrales Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe 3, n-Hexan) gereinigt. Die vereinigten zitronengelben Produkt-Fractionen wurden am Rotationsverdampfer vollständig vom Lösungsmittel befreit und aus Ethanol umkristallisiert. 9-Nitrophenanthren (**26**) wurde in Form gelber Kristalle erhalten.

Ausbeute: 3.55 g (15.9 mmol) 9-Nitrophenanthren (**26**), 35 %

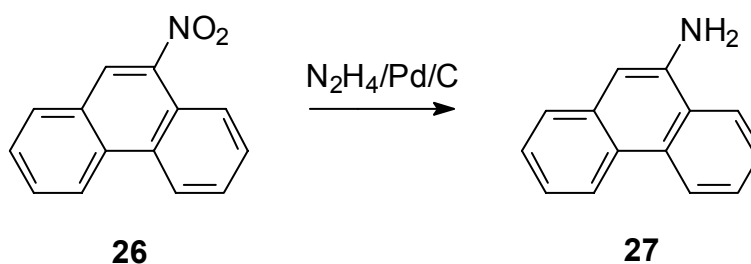
Schmelzpunkt: 116 °C (Lit.^[133]: 117 °C)

Charakterisierung:



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.65 - 7.80 (m, 4 H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H), 7.96 (dd, 1 H, 9-H, ³ J {9-H,10-H} = 8.0 Hz, ⁴ J {9-H,11-H} = 0.5 Hz), 8.42 (s, 1 H, 6-H), 8.46 (m, 1 H, 4-H), 8.64 (d, 1 H, 1-H, ³ J {1-H,2-H} = 8.4 Hz), 8.70 (m, 1 H, 12-H).

11.6.19 9-PHENANTHRYL-AMIN (**27**)^[134]



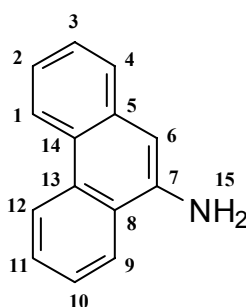
Zu einer Lösung von 3.40 g ($M = 223.23$ g/mol, 15.2 mmol) 9-Nitrophenanthren (**26**) in 500 mL absolutem Ethanol wurden unter Inertgasatmosphäre 1.50 g Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) gegeben und anschließend 20.0 mL (411 mmol) Hydrazin Monohydrat in 50.0 mL absolutem Ethanol über einen Zeitraum von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde zunächst 15 Minuten bei Raumtemperatur und danach weitere 45 Minuten unter Rückfluss gerührt. Die dünnschichtchromatographische Beobachtung (neutrales Aluminiumoxid, n-Hexan/Chloroform = 4 : 1 v/v) der Reaktionsmischung zeigte nach dieser Reaktionszeit den vollständigen

Umsatz der Nitroverbindung an. Nach dem Abkühlen wurde über Celite filtriert und die orangegelbe Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Das orangegelbe Rohprodukt wurde aus Petrolether (100 - 120 °C) umkristallisiert. 9-Phenanthrylamin (**27**) fiel in Form hellgelber Kristalle an.

Ausbeute: 1.77 g (0.18 mmol) 9-Phenanthryl-amin (**27**), 60 %

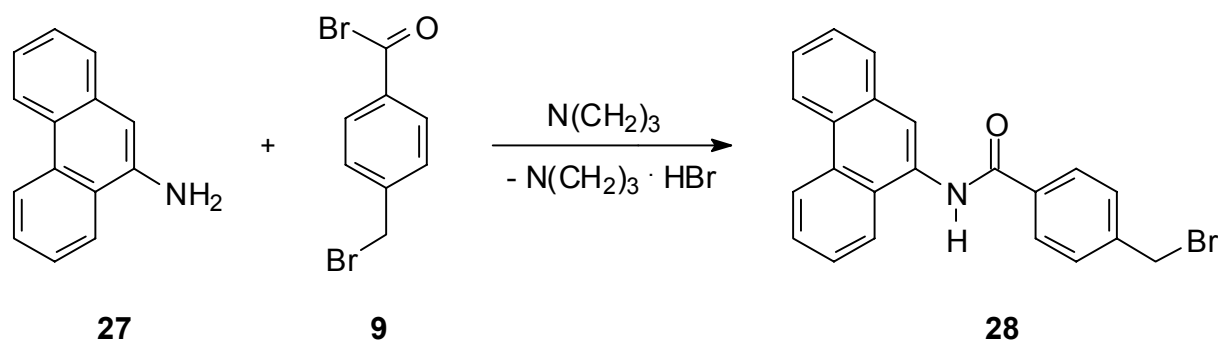
Schmelzpunkt: 134 °C (Lit.^[134]: 134 - 135 °C)

Charakterisierung:



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.10 (s, 2 H, 15-H), 6.97 (s, 1 H, 6-H), 7.44 (ddd, 1 H, 2-H, $^3J\{2\text{-H},3\text{-H}\} = ^3J\{2\text{-H},1\text{-H}\} = 7.0$ Hz, $^4J\{2\text{-H},4\text{-H}\} = 1.4$ Hz), 7.51 (ddd, 1 H, 3-H, $^3J\{3\text{-H},2\text{-H}\} = ^3J\{3\text{-H},4\text{-H}\} = 8.0$ Hz, $^4J\{3\text{-H},1\text{-H}\} = 1.2$ Hz), 7.61 - 7.69 (m, 3 H, 4-H, 10-H, 11-H), 7.91 (dd, 1 H, 9-H, $^3J\{9\text{-H},10\text{-H}\} = 8.0$ Hz, $^4J\{9\text{-H},11\text{-H}\} = 0.9$ Hz), 8.57 (d, 1 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 8.71 (dd, 1 H, 12-H, $^3J\{12\text{-H},11\text{-H}\} = 8.2$ Hz, $^4J\{12\text{-H},10\text{-H}\} = 0.7$ Hz).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 107.36 (6-C), 121.25 (9-C), 122.42 (1-C), 123.32, 123.35 (2-C, 12-C), 125.43 (8-C), 126.09 (14-C), 126.23, 126.26 (4-C, 11-C), 126.58 (10-C), 126.84 (3-C), 131.11 (13-C), 133.18 (5-C), 139.83 (7-C).

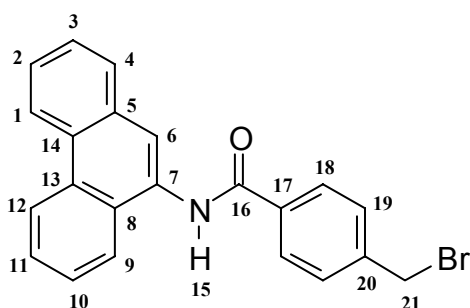
11.6.20 4-(BROMMETHYL)-*N*-9-PHENANTHRYL-BENZAMID (**28**)

Eine Lösung von 1.31 g ($M = 277.94 \text{ g/mol}$, 4.71 mmol) 4-Bromomethyl-benzoylbromid (**8**) in 20.0 mL absolutem Acetonitril wurde bei Raumtemperatur und unter Inertgasatmosphäre langsam zu einer Lösung von 700 mg ($M = 193.25 \text{ g/mol}$, 3.62 mmol) 9-Phenanthryl-amin (**27**) und 662 μL (477 mg, 4.71 mmol) Triethylamin in 50.0 mL absolutem Acetonitril getropft. Die Reaktionsmischung wurde 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Das braune Filtrat wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt, zweimal mit je 15.0 mL Chloroform im Ultraschallbad digeriert und wiederum abfiltriert. Nach dem Entfernen von Lösungsmittelresten im Ölpumpenvakuum konnte 4-(Bromomethyl)-*N*-9-phenanthryl-benzamid (**28**) als beigefarbener Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 970 mg (2.49 mmol) 4-(Bromomethyl)-*N*-9-phenanthryl-benzamid (**28**), 69 %

Schmelzpunkt: 211 °C

Charakterisierung:

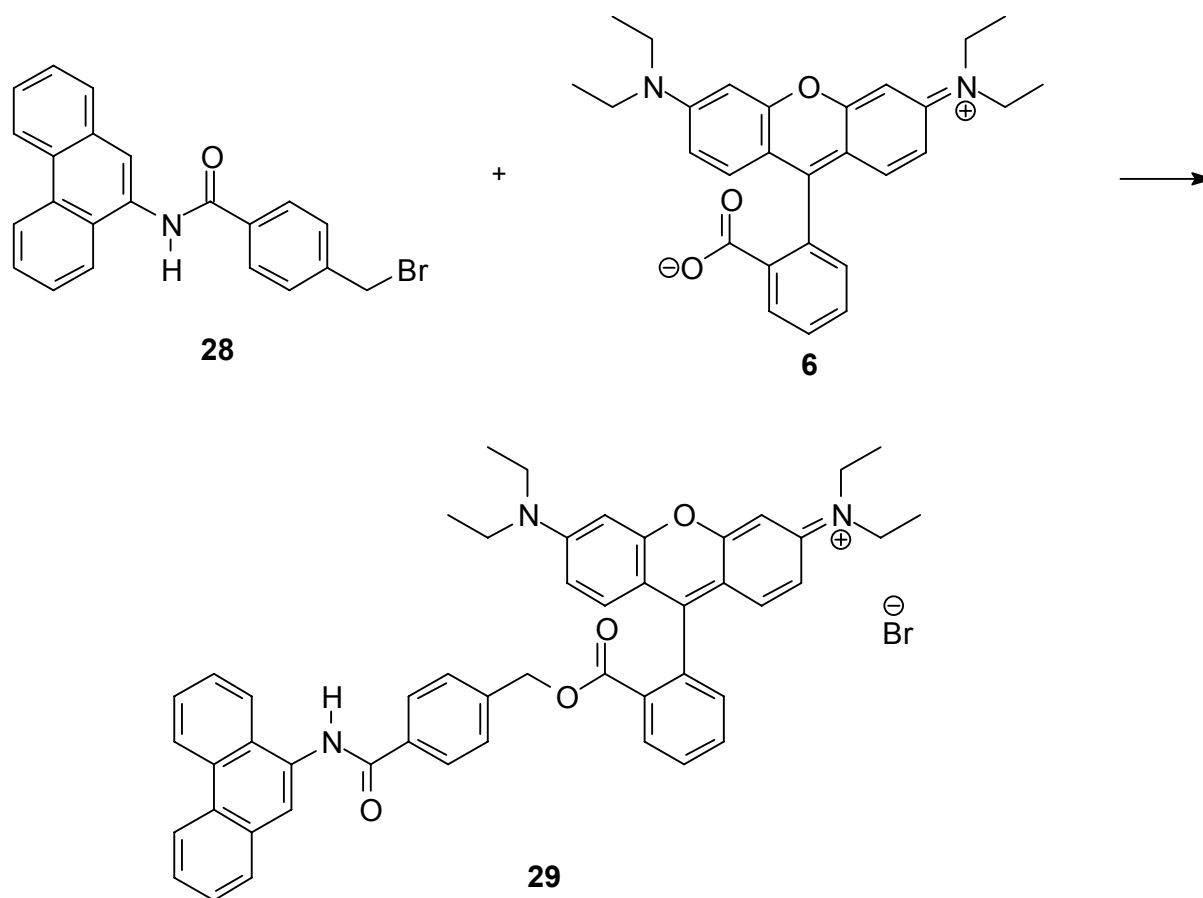


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 4.78 (s, 2 H, 21-H), 7.61 - 7.73 (m, 6 H, 2-H, 3-H, 10-H, 11-H, 19-H), 7.94 (s, 1 H, 6-H), 7.98 (d, 1 H, 9-H, $^3J\{9\text{-H},10\text{-H}\} = 7.7$ Hz, $^4J\{9\text{-H},11\text{-H}\} = 1.3$ Hz), 8.05 - 8.09 (m, 3 H, 4-H, 18-H, $^3J\{18\text{-H},19\text{-H}\} = 8.4$ Hz), 8.82 (d, 1 H, 1-H, $^3J\{1\text{-H},2\text{-H}\} = 8.0$ Hz), 8.88 (d, 1 H, 12-H, $^3J\{12\text{-H},11\text{-H}\} = 8.2$ Hz), 10.50 (s, 1 H, 15-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 33.41 (21-C), 122.75 (1-C), 123.11 (12-C), 123.80 (4-C), 123.92 (6-C), 126.66, 126.69, 126.92, 127.02 (2-C, 3-C, 10-C, 11-C), 128.12 (18-C), 128.23 (9-C), 128.62, 128.63 (7-C, 13-C), 129.26 (19-C), 130.40 (8-C), 131.11 (14-C), 131.94 (5-C), 134.11 (17-C), 141.56 (20-C), 165.86 (16-C).

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3266 (m, $\nu(\text{NH})$), 3073, 3050 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$), 1643 (s, $\nu(\text{CO}_{\text{Amid}})$), 1531 (s, $\delta(\text{NH}_{\text{Amid}})$).

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) = 390 (100) $[\text{M}^+]$, 311 (17) $[\text{M}^+ - \text{Br}]$.

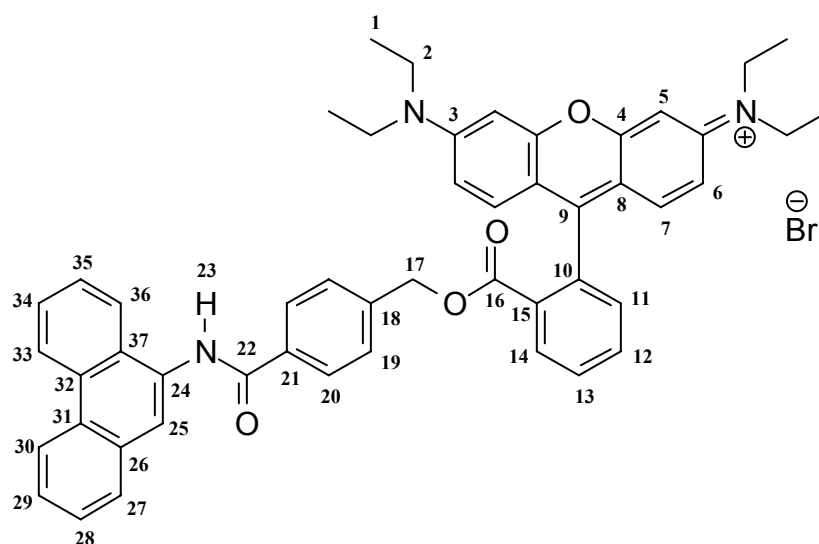
11.6.21 RHODAMIN B-4-[(PHENANTHREN-9-YL)AMINOCARBONYL]BENZYLESTER (**29**)

Eine Lösung von 133 mg ($M = 442.56 \text{ g/mol}$, 0.30 mmol) Rhodamin B Base (**6**) und 120 mg ($M = 390.28 \text{ g/mol}$, 0.30 mmol) 4-(Brommethyl)-*N*-9-phenanthryl-benzamid (**28**) in 5.00 mL absolutem Dimethylformamid wurde 22 Stunden bei 90 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei einer Temperatur < 85 °C abkondensiert, das Feststoffgemisch in 15.0 mL warmem Dichlormethan aufgeschlämmt und unlösliche Bestandteile abfiltriert. Das lilafarbene Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an basischem Aluminiumoxid gereinigt (1. Toluol/Ethanol = 4:1, v/v und 2. Ethanol). Die vereinigten Produktfraktionen wurden zunächst am Rotationsverdampfer vollständig eingengt und anschließend im Ölpumpenvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) wurde als dunkelroter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 159 mg (0.19 mmol) Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)amino-carbonyl]benzylester (**29**), 64 %

Schmelzbereich: 176 - 178 °C

Charakterisierung:



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.23 (t, 12 H, 1-H), 3.46 - 3.66 (m, 8 H, 2-H), 4.92 (s, 2 H, 17-H), 6.77 (dd, 2 H, 6-H, ³J{6-H,7-H} = 9.5 Hz, ⁴J{6-H,5-H} = 2.4 Hz), 6.89 - 6.91 (m, 4 H, 5-H, 20-H, ⁴J{5-H,6-H} = 2.5 Hz), 6.96 (d, 2 H, 7-H, ³J{7-H,6-H} = 9.5 Hz), 7.22 - 7.23 (m, 1 H, 11-H), 7.52 (ddd, 1 H, 28-H, ³J{28-H,29-H} = ³J{28-H,27-H} = 7.9 Hz, ⁴J{28-H,30-H} = 1.0 Hz), 7.56 - 7.62 (m, 3 H, 29-H, 34-H, 35-H), 7.71 - 7.77 (m, 2 H, 12-H, 13-H), 7.85 (d, 1 H, 27-H, ³J{27-H,28-H} = 7.9 Hz), 8.14 (s, 1 H, 25-H), 8.18 (dd, 1 H, 36-H, ³J{36-H,35-H} = 7.5 Hz, ⁴J{36-H,34-H} = 1.9 Hz), 8.29 - 8.33 (m, 3 H, 14-H, 19-H, ³J{19-H,20-H} = 8.0 Hz), 8.62, 8.68 (2 d, je 1 H, 30-H, 33-H, ³J{33-H,34-H}/³J{30-H,29-H} = 8.1 Hz/7.4 Hz), 10.38 (s, 1 H, 23-H).

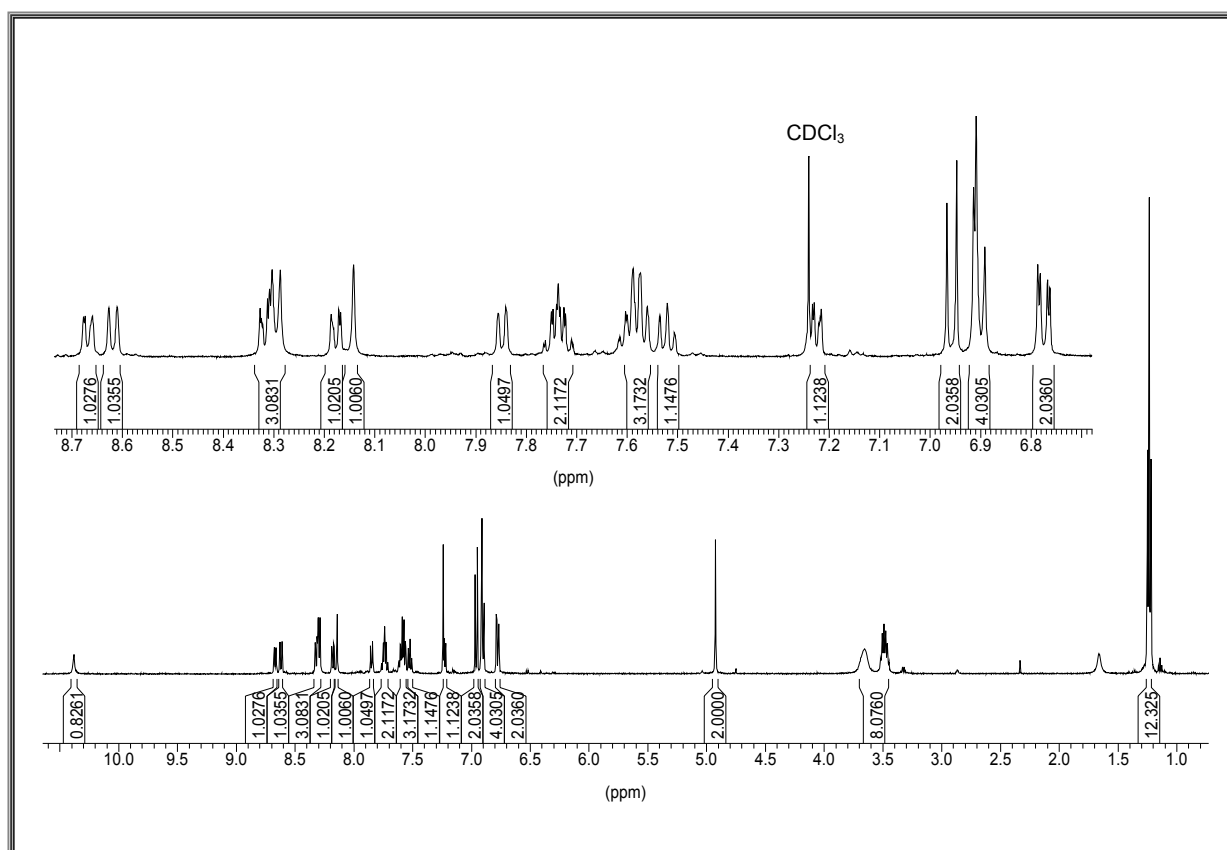


Abbildung 35: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Referenz **29** in CDCl_3

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.66 (1-C), 46.21 (2-C), 67.21 (17-C), 97.03 (5-C), 113.30 (3-C), 114.01 (6-C), 122.37, 122.84 (30-C, 33-C), 123.71 (25-C), 124.00 (36-C), 126.12 (28-C), 126.47, 126.57 (29-C, 34-C, 35-C), 128.14 (19-C), 128.69 (27-C), 128.73, 131.14, 131.93, 133.18 (26-C, 31-C, 32-C, 37-C), 128.95 (20-C), 129.47 (26-C), 129.93 (11-C), 130.21 (10-C), 130.28 (12-C), 130.83 (7-C), 131.60 (14-C), 132.09 (31-C), 132.82 (13-C), 134.39 (21-C), 136.95 (18-C), 155.35 (8-C), 157.32, 157.41 (4-C, 9-C), 165.17 (16-C), 166.30 (22-C).

IR (KBr-Verreibung): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3430 (m, $\nu(\text{NH})$), 2976 (w, $\nu(\text{CH}_{\text{Aliph}}$), 1718 (m, $\nu(\text{C=O}_{\text{Ester}})$), 1648 (m, $\nu(\text{C=O}_{\text{Amid}}$), 1588 (s, $\nu(\text{C=C}_{\text{Aryl}}$), 1180 (s, $\nu(\text{C-O}_{\text{Ester}})$).

MS (FAB, 40 kV): m/z (%) = 752 (100) [$\text{M}^+ - \text{Br}$], 443 (12) [Rhodamin B Base + H^+].

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Ethanol):

berechnet (für $C_{50}H_{46}N_3O_4$): 752.3488

gefunden: 752.3498

Abweichung: 1.3 ppm.

UV-Vis (Chelex-behandelte gepufferte Lösung, 2.00 mM Ascorbinsäure aus frisch zubereiteter Stammlösung, 0.18 % w/v SDS und 10.0 mM Tris/HCl, pH 8.2, 22 °C):

$\lambda_{\max}(\lg \varepsilon) = 567 \text{ nm (4.80)}, 510 - 540 \text{ nm (br sh)}$.

11.7 Untersuchung der Fluoreszenzsonden im zellfreien System

11.7.1 REDUKTION DER SCHWERMETALLKONTAMINATION VERWENDETER MEDIEN

Zur Vermeidung von Schwermetallkontaminationen wurden alle verwendeten Medien für die Darstellung von Indikatorlösungen im zellfreien System zunächst mittels einer modifizierten Standardmethode^[146] mit dem Schwermetallkomplexbildnerharz Chelex 100 behandelt. Dazu wurden 50.0 mL der zu behandelnden Lösung in einem Falcon-Röhrchen entsprechenden Volumens mit 2.00 g Chelex 100 versetzt und das verschlossene Gefäß bei 4 °C für mindestens acht Stunden maschinell geschüttelt. Die Suspension konnte im Kühlraum unter Lichtausschluss über mehrere Wochen gelagert oder nach Abdekantieren des Komplexbildnerharzes und pH-Wert-Einstellung sofort eingesetzt werden. Da Chelex 100 den pH-Wert der Lösungen erhöht, muss der pH-Wert der entsprechenden Lösung vor Verwendung kontrolliert und neu eingestellt werden. Dazu wurde in der Regel 6.00 M Salzsäure genutzt.

Die nach der Chelex-Behandlung verbleibende Restkontamination durch Schwermetallionen wurde beispielhaft für das einfache, gepufferte Medium (10.0 mM Tris/HCl, 2.00 mM Ascorbinsäure, 0.18 % w/v SDS, pH = 8.2) mittels AAS bestimmt.

Der Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen betrug:

Fe: 2.1 µg/L

Cu: 2.4 µg/L

(Restkontamination ~ 2 ppm).

11.7.2 ANALYSE DES FLUORESZENZVERHALTENS IN AN- UND ABWESENHEIT VON Fe^{2+} -IONEN

Zur Aufnahme der Absorptions- und Fluoreszenzspektren der potentiellen Fluoreszenzindikatoren **7**, **11** und **17** im zellfreien System wurden zunächst Stammlösungen (1.00 mM) der Indikatoren in Dimethylsulfoxid angefertigt. Diese Lösungen wurden aliquotiert und konnten über mehrere Wochen unter Lichtausschluss bei einer Temperatur von - 30 °C gelagert werden. Aliquots dieser Stammlösungen wurden zur Herstellung von 10.0 μM gepufferten, schwermetallfreien Indikatorlösungen verwendet. Dazu wurde 10.0 mM Tris/HCl-Puffer in der beschriebenen Weise von Schwermetallkontaminationen befreit, im Anschluss auf einen der mitochondrialen Matrix entsprechenden pH-Wert von 8.2 eingestellt und mit 0.18 % w/v SDS versetzt. Für Fluoreszenzmessungen in Gegenwart von Fe^{2+} -Ionen wurde der vor Messbeginn eisenfreien Indikatorlösung vor pH-Wert-Einstellung zusätzlich Ascorbinsäure in einer Endkonzentration von 2.00 mM zugesetzt und nochmals über einen Zeitraum von zwei Stunden mit Chelex behandelt und erst danach erfolgten die pH-Wert-Einstellung sowie die Zugabe des Lösungsvermittlers. Die Indikatorlösungen wurden eisenfrei und nach sukzessiver Zugabe einer Fe^{2+} -Stammlösung (Endkonzentrationen: 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.50, 3.30, 8.00 μM Fe^{2+}) am Fluoreszenzspektrometer Fluoroscanner FL 3095 unter Verwendung von Quarzglas-küvetten ($d = 1.00$ cm) untersucht. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte stets durch Anregung im Absorptionsmaximum des jeweiligen Indikators. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 22 °C aufgenommen.

Die auch für spätere *ex situ*-Kalibrierungen verwendete Fe^{2+} -Salzlösung wurde wie folgt zubereitet:

In 10.0 mL bidestilliertem Wasser wurden zunächst 29.4 mg Trinatriumcitrat Dihydrat gelöst und im Anschluss 39.2 mg $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ Hexahydrat (Mohr'sches Salz) zugesetzt. Dieser Stammlösung (10.0 mM) wurde ein Volumen von 100 μL entnommen und einer Lösung von 3.52 mg Ascorbinsäure in 900 μL bidestilliertem Wasser zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 und nicht über 120 Minuten wurde die Fe^{2+} -Salzstammlösung eingesetzt. Die Endkonzentrationen betrugen 1.00 mM Fe^{2+} , 1.00 mM Citrat und 20.0 mM Ascorbinsäure.

Zur Vermeidung von Kalibrierungsfehlern wurde die Eisenlösung mittels AAS auf ihren Eisen- und Kupfergehalt untersucht. In zwei unabhängigen Messungen wurden folgende Mittelwerte erhalten:

Fe: 54460 µg/L

Cu: 13 µg/L,

d. h. die tatsächliche Fe^{2+} -Ionenkonzentration betrug durchschnittlich 0.98 mM.

Um einen Einfluss des in späteren zellulären Messungen verwendeten Entquenchers Pyridoxalisonicotinoylhydrazon (PIH) auf die Indikatorfluoreszenz bzw. die Eisen-induzierte Fluoreszenzlöschung auszuschließen, wurde den Indikatorlösungen zur Kontrolle PIH in einer Endkonzentration von 2.00 mM zugefügt und erneut das Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

11.7.3 *EX SITU*-KALIBRIERUNGEN

Die Untersuchung der Eisen-induzierten Löschung der Indikatorfluoreszenz zur Bestimmung der Komplexstöchiometrie und die Bestimmung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Indikatorkonzentration wurden unter normoxischen Bedingungen in zwei verschiedenen Medien, dem „einfachen“ Puffermedium (10.0 mM Tris/HCl, 2.00 mM Ascorbinsäure, 0.18 % w/v SDS, pH = 8.2) und dem der mitochondrialen Matrix nachempfundenen Medium (siehe Kapitel 11.4, pH = 8.2), durchgeführt. Für Fluoreszenzmessungen am Laser-Scanning-Mikroskop wurden zunächst Aliquots der genannten Medien (1.00 mL) in temperierte (37 °C) Eppendorf-Cups überführt und durch Zugabe von Aliquots der Indikator-Stammlösungen (1.00 mM) Indikatorstandards mit Konzentrationen von 15.0, 30.0 und 45.0 µM bzw. 20.0 - 80.0 µM hergestellt. Dem Eppendorf-Cup wurden dann 100 µL der jeweiligen Indikatorlösung entnommen und auf ein Deckgläschen in einer temperierten (37 °C) Pentz-Kammer aufgebracht. Für jede Messung wurde ein neues bzw. ungebrauchtes Deckgläschen eingesetzt. Die Pentz-Kammer wurde auf dem beheizten Mikroskoptisch ausgerichtet und die Fluoreszenz der Lösungen innerhalb der Flüssigkeitssäule in einer Fokusebene von 10.0 µm über der Deckglasoberfläche unter Verwendung des Helium/Neon-Lasers ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$) sowie des Objektivs 63x NA 1.40 Plan-Apochromat gemessen. Die 15.0, 30.0 und 45.0 µM

Indikatorlösungen wurden des weiteren mit definierten Konzentrationen der 1.00 mM Fe^{2+} -Stammlösung (siehe 11.7.2) titriert und je drei Minuten nach Zugabe der Fe^{2+} -Salzlösung die resultierende Fluoreszenz der Lösung in beschriebener Weise bestimmt.

11.7.4 UNTERSUCHUNGEN ZU BIOLOGISCH RELEVANTEN EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE INDIKATORFLUORESZENZ

Auch der Einfluss verschiedener biologisch relevanter Faktoren auf die Indikatorfluoreszenz und die Eisen-induzierte Fluoreszenzlöschung wurde am Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt. Zunächst wurden dazu 1.00 mM Stammlösungen von Fe^{2+} ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ /Trinatriumcitrat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, siehe 11.7.2), Fe^{3+} (FeCl_3) sowie von Mn^{2+} (MnCl_2), Ni^{2+} (NiSO_4), Cu^{2+} (CuCl_2), Co^{2+} (CoCl_2) und Zn^{2+} (ZnCl_2) in bidestilliertem Wasser bzw. eine 10.0 mM Stammlösung von Cu^+ (CuCl) in 1.00 M Salzsäure angefertigt. Diese Salzlösungen wurden in Endkonzentrationen von 2.00 und 20.0 μM zu 20.0 μM Lösungen der Indikatoren **11** und **17** in „mitochondrialem“ Medium pipettiert und die Fluoreszenz der Lösungen mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$, Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) in genannter Vorgehensweise (siehe 11.7.3) bestimmt. Fluoreszenzmessungen in Gegenwart von Fe^{3+} - und Cu^{2+} -Ionen wurden in Abwesenheit der Reduktionsmittel Glutathion und Ascorbinsäure vorgenommen.

Der Effekt einer sich ändernden Ionenstärke und Osmolarität des Mediums auf die Indikatorfluoreszenz bzw. die Eisen-induzierte Fluoreszenzlöschung wurde durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten einer 15.0 μM Indikatorlösung in „einfachem“ Medium und in „mitochondrialem“ Medium bei 37 °C jeweils in Anwesenheit von 0.00 bis 7.00 μM Fe^{2+} (Fe-Stammlösung siehe 11.7.2) bestimmt. Durch diesen Vergleich waren außerdem Aussagen zum Einfluss biologisch relevanter Eisenchelatoren wie Citrat und ATP sowie anderer intrazellulär vorliegender Alkali- und Erdalkalimetallionen wie Na^+ und Ca^{2+} möglich.

Die pH-Abhängigkeit (im Bereich von pH = 6.5 - 10.0) der Indikatorfluoreszenz bzw. der Eisen-induzierten Fluoreszenzlöschung wurde durch Titration einer 20.0 μM Indikatorlösung (in einfachem, gepuffertem Medium) mit 6.00 M Salzsäure bei 37 °C untersucht. Dazu wurde das Medium zunächst mit definierten Volumina der

Salzsäure titriert und jeweils der pH-Wert der Lösung notiert. Im Anschluss wurde die Titration während der Fluoreszenzmessungen am Laser-Scanning-Mikroskop wiederholt und der Einfluss der verschiedenen pH-Werte auf die Fluoreszenz bzw. ihre Löschung durch die Anwesenheit von 0.00 bis 6.60 μM Fe^{2+} untersucht.

Viskositätsänderungen des „mitochondrialen“ Mediums wurden durch Zusatz einer 1.75 M Saccharose-Lösung zum „einfachen“ Medium (37 °C) simuliert. Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten der Indikatorlösungen in An- und Abwesenheit von Saccharose verglichen.

11.8 Anwendung der Fluoreszenzsonden im zellulären System

11.8.1 ZELLPRÄPARATION UND ZELLKULTIVIERUNG

Die Präparation und Kultivierung der Zellen wurde freundlicherweise von Frau Birgit Lammers und Frau Nathalie Boschenkov (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

11.8.1.1 Präparation und Kultivierung von Rattenhepatozyten

Die Hepatozytenisolation erfolgte nach der von de Groot et al.^[147] beschriebenen Methode. Die für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen vorgesehenen Hepatozyten wurden mit einer Dichte von 1.70×10^5 Zellen/ cm^2 (ermittelt mit einer Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim/Main, Deutschland) auf kollagenbeschichteten Deckgläschen (6.20 cm^2) in Zellkultur-Petrischalen eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in L-15 Medium, ergänzt mit fötalem Kälberserum (5.0 %), L-Glutamin (2.0 mM), Glukose (8.3 mM), Rinderserumalbumin (0.1 %), Natriumhydrogencarbonat (14.3 mM), Gentamicin (50 $\mu\text{g/mL}$) und Dexamethason (1.0 μM) bei einer Temperatur von 37 °C in einer Atmosphäre von 5.00 % CO_2 /95.0 % Raumluft mit einer Luftfeuchtigkeit von 100 % (Brutschrank Modell 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland). Zwei Stunden nach dem Einsetzen wurden die

Zellen mit HBSS gewaschen und für weitere 20 - 24 Stunden bis zum Beginn der Experimente kultiviert.

11.8.1.2 Kultivierung der Rattenleberendothelzellen

Leberendothelzellen einer Zelllinie, die aus der Leber männlicher Ratten des Wistar-Stammes etabliert wurde,^[148] wurden in RPMI 1640-Medium, ergänzt mit fötalem Kälberserum (20 %), L-Glutamin (2.0 mM), Penicillin/Streptomycin (50 U/mL bzw. 50 µg/mL) und Dexamethason (1.0 µM) (pH = 7.35), kultiviert. Subkulturen wurden durch Trypsinisierung gewonnen. Die Zellen wurden 1 : 3 gesplittet, auf fibronektin-beschichteten Deckgläschen (6.20 cm²) in Zellkulturpetrischalen eingesetzt und zwei Tage nach der Subkultivierung für die Experimente verwendet.

11.8.2 DIE SUBZELLULÄRE VERTEILUNG DER FLUORESZENZINDIKATOREN

Experimente unter Einsatz von Rattenhepatozyten wurden jeweils 20 bis 24 Stunden nach der Zellisolation begonnen. Zur Analyse der subzellulären Verteilung der Indikatoren **11** und **17** wurden die Deckgläschen mit den adhärenenten Hepatozyten in Pentz-Kammern eingeschraubt, die Zellen zweimal mit je 2.00 mL HBSS (37 °C) gewaschen, anschließend in der Dunkelkammer simultan mit Indikator **11** oder **17** (jeweils 0.20 - 1.00 µM) und einer identischen Konzentration an Rhodamin 123 in HBSS beladen (20 min, 37 °C). Um eine möglichst gleichmäßige Beladung der Zellen sicherzustellen, wurden entsprechend 1.20 bis 6.00 µL der jeweiligen Indikator-Stammlösungen (1.00 mM) zu 6.00 mL HBSS (37 °C) pipettiert und die Zellen mit den resultierenden verdünnten Indikatorlösungen bedeckt. Um die Indikatoren und auch die Zellen vor einer photochemischen Schädigung zu schützen, wurden die beladenen Zellen ausschließlich unter Lichtausschluss behandelt. Im Anschluss an die Beladung wurden die Zellen zweimal mit HBSS (37 °C) gewaschen, um extrazellulär vorliegenden Indikator zu entfernen. Eine Nachinkubation von zehn Minuten bei 37 °C sollte die vollständige intramitochondriale Akkumulation und somit eine selektive Beladung der Mitochondrien gewährleisten. Unmittelbar vor der Fluoreszenzmessung wurden die Zellen noch einmal mit

indikatorfreiem HBSS behandelt, um gegebenenfalls ausgeleckten Indikator zu entfernen. Die Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der sowohl mit Indikator als auch mit Rhodamin 123 beladenen Mitochondrien erfolgten nach erneutem Befüllen der Pentz-Kammern mit 6.00 mL HBSS (37 °C) am Laser-Scanning-Mikroskop bei $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$ (zur Erfassung der roten Indikatorfluoreszenz) und $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 - 530 \text{ nm}$ (zur Erfassung der grünen Rhodamin 123-Fluoreszenz) in sukzessiven Scans unter Verwendung des Objektivs 63x NA 1.40 Plan-Apochromat.

Zur Aufhebung der partiellen Löschung der intramitochondrialen Indikatorfluoreszenz wurde PIH (2.00 mM) in die Pentz-Kammern gegeben und der Fluoreszenzanstieg über einen Zeitraum von 120 Minuten gemessen.

Darstellung der PIH-Lösung für zelluläre Anwendungen:

In 200 μL 0.10 M Natriumhydroxidlösung wurden im Ultraschallbad 5.72 mg PIH gelöst. 140 μL dieser Lösung wurden in einem Eppendorf-Cup mit 860 μL auf 37 °C temperiertem HBSS verdünnt. Die entstehende Lösung wurde unmittelbar vor dem zellulären Einsatz mit 1.00 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 7.35 eingestellt. Durch Zugabe dieser Lösung zu einem Volumen von 6.00 mL HBSS wurde eine Endkonzentration von 2.00 mM PIH in den Pentz-Kammern erreicht.

Kultivierte Rattenleberendothelzellen wurden zwei Tage nach der Subkultivierung entsprechend der oben genannten Bedingungen mit 0.10 bis 1.00 μM Indikatorlösungen in HBSS (20 min, 37 °C) beladen, indikatorfrei nachinkubiert (10 min, 37 °C) und ihre intrazelluläre Fluoreszenzintensität bestimmt.

11.8.3 DETEKTION INTRAMITOCHONDRIALEN CHELATISIERBAREN EISENS

Das Fluoreszenzverhalten der intramitochondrialen Indikatoren Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]benzylester (**11**) und Rhodamin B-4-[(2,2'-bipyridin-4-yl)aminocarbonyl]benzylester (**17**) sollte sowohl bei experimenteller Erniedrigung als auch Erhöhung der Konzentration des verfügbaren intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens in kultivierten Rattenhepatozyten untersucht werden.

Zur Erniedrigung der Konzentration des intramitochondrial verfügbaren chelatisierbaren Eisens wurde PIH (2.00 mM) zugefügt. Zur Erhöhung des genannten Eisenpools diente eine Fe^{3+} -Ionen-enhaltende Lösung:

Herstellung einer 10.0 μM Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin-Lösung:

In 10.0 mL Dimethylsulfoxid wurden zunächst 29.4 mg 8-Hydroxychinolin (20.0 mM) gelöst. Dieser farblosen Lösung wurden unter Rühren 27.0 mg Eisen(III)chlorid Hexahydrat (10.0 mM) zugefügt. Die sofort eintretende Bildung des membran-permeablen Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin-Komplexes kann anhand der tief-schwarzen Färbung der resultierenden Lösung erkannt werden. Um eine Endkonzentration von 10.0 μM Fe^{3+} innerhalb der Messkammern zu erreichen, mussten 6.00 μL der Fe^{3+} -Salzlösung zu 6.00 mL HBSS gegeben werden.

Kultivierte Rattenhepatozyten wurden mit 1.00 μM Indikator in HBSS (20 min, 37 °C) in einer modifizierten Pentz-Kammer unter Lichtausschluss in genannter Vorgehensweise beladen und in indikatorfreiem HBSS nachinkubiert (10 min, 37 °C). Darauf-folgend wurde die intramitochondriale Ausgangsfluoreszenz bestimmt, dann die PIH-Lösung (2.00 mM) in den Zellüberstand gegeben und nach zwei Stunden unter identischen Scanning-Parametern ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$, Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) eine zweite Fluoreszenzmessung vorgenommen. Um den Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Entquenchung noch innerhalb des Detektorbereiches visualisieren zu können, musste die Bestimmung der Ausgangs-fluoreszenz bei geringer Laserleistung und Detektorempfindlichkeit erfolgen. Im Gegensatz dazu wurden zur Bestimmung der Fluoreszenz vor Erhöhung des intramitochondrialen Eisenpools durch Zugabe von Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin (10.0 μM) die Geräteeinstellungen so gewählt, dass der Ausgangswert relativ hoch und somit eine Abnahme der Fluoreszenzintensität gut detektierbar war. Fluoreszenz-messungen nach Zugabe des eisenfreien Liganden 8-Hydroxychinolin in entsprechender Konzentration dienten als Kontrolle.

11.8.4 QUANTIFIZIERUNG INTRAMITOCHONDRIALEN CHELATISIERBAREN EISENS

Zur Bestimmung des intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens kultivierter Rattenhepatozyten wurden die Zellen in genannter Vorgehensweise (11.8.2) mit Indikator ($0.20\ \mu\text{M}$, 20 min, $37\ ^\circ\text{C}$) beladen und nachinkubiert (10 min, $37\ ^\circ\text{C}$). Der zur Beladung eingesetzten Indikatorlösung wurde in allen quantitativen Messungen Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA, $10.0\ \mu\text{M}$) zugesetzt. Dazu wurde eine $0.10\ \text{M}$ DTPA-Stammlösung in $1.00\ \text{M}$ wässriger Natriumhydroxidlösung zubereitet und mit $6.00\ \text{M}$ Salzsäure auf einen pH-Wert von 7.35 eingestellt. Vor der Nachinkubation in indikatorfreiem HBSS wurde das jeweilige Deckgläschen mit den adhären Hepatozyten in eine zweite, vortemperierte Pentz-Kammer überführt, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch eventuell an der Kammerwand anhaftende Indikatorreste zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte die Auswahl morphologisch repräsentativer Zellen. Dabei war vor allem auf eine ausreichende Zellenzahl (30 - 40) zu achten. Die nachfolgenden Fluoreszenzmessungen wurden in HBSS ($37\ ^\circ\text{C}$) am Laser-Scanning-Mikroskop ($\lambda_{\text{exc}} = 543\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560\ \text{nm}$, Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) durchgeführt. Nach jeweils drei Aufnahmen der zellulären Ausgangsfluoreszenz im Abstand von zehn Minuten wurde dem Zellüberstand PIH ($2.00\ \text{mM}$) zugesetzt und danach in Zeitintervallen von etwa zehn Minuten der intrazelluläre Fluoreszenzanstieg aufgezeichnet. Bei PIH-Zugabe war vor allem auf ein gleichmäßiges Verteilen der Entquencherlösung auf den Zellen ohne Verrücken der Messkammer zu achten. Für jeden Messzeitpunkt wurde das Gesichtsfeld auf Objektbewegungen überprüft und bei Bedarf manuell repositioniert. Während der gesamten Messzeit wurden die Messkammern zur Konstanthaltung des Zellüberstandsvolumens mit einem Deckgläschen verschlossen gehalten. 20 Minuten nach kompletter Entquenchung bzw. nach Ende des intramitochondrialen Fluoreszenzanstiegs wurden dem Zellüberstand $5.00\ \mu\text{g/mL}$ Propidiumiodid in bidestilliertem Wasser zugesetzt und unter identischen Parametern eine Bildaufnahme gestartet. Bei der nachfolgenden Bildanalyse wurden Propidiumiodid-positive, d. h. tote Zellen sowie Zellen, deren intramitochondriale Fluoreszenzintensität außerhalb des Detektorbereiches lag, nicht berücksichtigt. Zur Auswertung der Messungen wurde die mittlere intramitochondriale Indikatorfluoreszenz nach Abzug des Leerwertes (Hintergrundfluoreszenz) bestimmt.

Die intramitochondriale Konzentration der eisenfreien und damit fluoreszierenden Indikatoren **11** und **17** wurde nun durch direkten Vergleich der mittleren intramitochondrialen Indikatorfluoreszenz (angegeben in *arbitrary units*, a.u.) vor und nach vollständiger Entquenchung durch PIH-Zugabe (2.00 mM) mit der Fluoreszenzintensität von 40.0 bis 100 μM Indikatorstandards in „einfachem“ Medium (37 °C) bestimmt. Die *ex situ*-Kalibrierungen wurden für jede einzelne Zellmessreihe analog zu Kapitel 11.7.3 am Laser-Scanning-Mikroskop auf Deckgläschen in Pentz-Messkammern vorgenommen. Dazu wurden exakt die Geräteeinstellungen verwendet, die der jeweils vorausgegangenen zellulären Messung zu Grunde lagen.

11.9 Die Referenzsubstanz im zellfreien System

Im zellfreien System wurden zunächst das Absorptions- und das Emissionsspektrum von Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]benzylester (**29**) in An- und Abwesenheit von Fe^{2+} -Ionen am Fluoreszenzspektrometer Fluoroscanner FL 3095 aufgenommen. Dazu wurde ebenfalls eine 1.00 mM Stammlösung der Referenz in Dimethylsulfoxid angefertigt und diese Lösung aliquotiert. Mit einem Aliquot dieser Stammlösung wurde analog zu 11.7.2 eine 10.0 μM Farbstofflösung in Chelex-behandeltem wässrigen Tris/HCl-Puffer (pH = 8.2) unter Zusatz von 0.18 % w/v SDS angefertigt und bei einer Temperatur von 22 °C am Fluoreszenzspektrometer Fluoroscanner FL 3095 in Ab- und Anwesenheit von Fe^{2+} vermessen ($\lambda_{\text{exc}} = 567 \text{ nm}$). Um die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Farbstoffkonzentration auch für die Referenz **29** sicherzustellen, wurden die Fluoreszenzintensitäten von Farbstofflösungen der Konzentrationen 0.00 bis 60.0 μM in „einfachem“ sowie „mitochondrialem“ Medium bei einer Temperatur von 37 °C am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ($\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$, Objektiv 63x NA 1.40 Plan-Apochromat) in der in Kapitel 11.7.3 beschriebenen Weise bestimmt. Die Linearität dieser Abhängigkeit wurde außerdem im direkten Vergleich zu Indikator **11** im „einfachen“ Medium unter analogen Geräteeinstellungen am Laser-Scanning-Mikroskop für die Temperaturen 37 °C und 4 °C geprüft. Im Falle der in der Kälte vorgenommenen Messungen wurde der bislang zur Temperierung der Pentz-Kammern eingesetzte elektrisch heizbare Mikroskoptisch durch einen flüssigkeits-

gekühlten Mikroskoptisch ersetzt. Dieser konnte mittels Kryostat auf die voreingestellte Temperatur von 4 °C abgekühlt und konstant temperiert werden. Die jeweilige Indikatorlösung wurde vor Aufbringen auf die Deckgläser gleichfalls auf 4 °C abgekühlt.

11.10 Die Referenzsubstanz im zellulären System

Colokalisationsuntersuchungen mit dem mitochondrienspezifischen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 wurden auch für die Referenz **29** (0.20 - 1.00 µM, 20 min Beladung, 10 min Nachinkubation, 37 °C) an kultivierten Rattenhepatozyten in Analogie zu den Indikatoren **11** und **17** (siehe 11.8.2) durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten bei einer Temperatur von 37 °C in Pentz-Kammern am Laser-Scanning-Mikroskop bei sukzessiver Anregung mit dem Helium/Neon-Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 585 \text{ nm}$) und dem Argon-Laser ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 505 - 530 \text{ nm}$) jeweils unter Verwendung des Objektivs 63x NA 1.40 Plan-Apochromat.

Zelluläre Fluoreszenzmessungen wurden des weiteren vor und nach Erniedrigung der Konzentration intramitochondrial verfügbarer chelatisierbarer Eisenionen durch Zugabe von PIH (2.00 mM) sowie vor und nach Erhöhung des genannten Eisenpools durch Zugabe des Fe^{3+} /8-Hydroxychinolin-Komplexes (10.0 µM) vorgenommen. Zur Beladung der Hepatozyten wurde auch hier eine 1.00 µM Farbstofflösung eingesetzt. Entsprechend der in Kapitel 11.8.3 beschriebenen Vorgehensweise wurde die zelluläre Ausgangsfluoreszenz vor und nach Manipulation des intramitochondrialen chelatisierbaren Eisenpools bei jeweils identischen Scanning-Parametern am Laser-Scanning-Mikroskop ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$) bestimmt.

Das Fluoreszenzverhalten von Indikator **11** und seiner Eisen-insensitiven Referenz **29** bei Zugabe des Entkopplers m-Chlorcarbonylcyanidphenylhydrazon (CCCP) zu mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen, kultivierten Rattenhepatozyten konnte am digitalen Attofluor-Fluoreszenzsystem ($\lambda_{\text{exc}} = 535 \pm 17 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 590 \text{ nm}$) in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet werden. Dazu wurde unmittelbar vor Messbeginn eine 10.0 mM Stammlösung von CCCP in Ethanol angefertigt. Nach dem Einbringen der adhärenenten Hepatozyten in die Pentz-Kammern und ihrer Beladung mit dem jeweiligen Farbstoff (0.50 µM, 37 °C) wurden die mit 6.00 mL HBSS befüllten

Messkammern auf dem vortemperierten Mikroskoptisch positioniert und nach Auswahl eines repräsentativen Gesichtsfeldes am Mikroskop für jede Zelle Messbereiche (ROIs) im Bereich großer Mitochondriendichte am Monitor des Attofluor-Systems definiert. Die intramitochondriale Fluoreszenzintensität konnte nun für diese Messbereiche in Zeitabschnitten von 120 Sekunden mittels digitaler Kamera detektiert werden. Über einen Zeitraum von 15 Minuten wurde zunächst die Ausgangsfluoreszenz erfasst. Nach dieser Zeit wurde dem Zellüberstand vorsichtig ein Aliquot der CCCP-Stammlösung bis zum Erreichen einer Endkonzentration von $10.0 \mu\text{M}$ CCCP in der Messkammer zugefügt und daraufhin der Abfall der intramitochondrialen Fluoreszenzintensität zeitabhängig aufgenommen ($\lambda_{\text{exc}} = 535 \pm 17 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 590 \text{ nm}$, 37°C), bis kein weiterer Fluoreszenzabfall mehr detektiert wurde. Die Verstärkereinstellung wurde auch für dieses Mikroskop-System stets so gewählt, dass die Intensität der intrazellulären Fluoreszenz sowohl unter Ausgangsbedingungen als auch nach entsprechender Einflussnahme innerhalb des Detektorbereiches lag. Die Fluoreszenzverläufe der einzelnen Messbereiche jeder Zelle konnten zu einem Mittel zusammengefasst und zeitabhängig aufgetragen werden.

11.11 Die Rolle mitochondrialen chelatisierbaren Eisens bei kälteinduzierter Zellschädigung

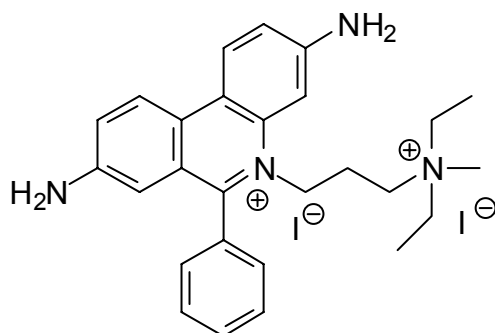
Um eine Veränderung der Konzentration intramitochondrialen chelatisierbaren Eisens unter hypothermen Bedingungen nachzuweisen, wurde das Fluoreszenzverhalten von Indikator Rhodamin B-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]-benzylester (**11**) und Referenz Rhodamin B-4-[(phenanthren-9-yl)aminocarbonyl]-benzylester (**29**) in vitalen Rattenhepatozyten bei Kaltinkubation vergleichend am Laser-Scanning-Mikroskop ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$) untersucht. Für jeden Versuch wurden Zellen der gleichen Präparation zunächst unter physiologischer Temperatur mit Indikator bzw. seiner Referenz beladen ($0.50 \mu\text{M}$, 20 min) und nach Kammerwechsel nachinkubiert (15 min). Im Anschluss wurden 6.00 mL Hydrogencarbonat-freien L-15 Mediums, dessen pH-Wert zuvor mit 5.00 M Natriumhydroxid-

lösung auf einen Wert von 7.10 bei 37 °C eingestellt wurde^Y, auf die Zellen gegeben, die Messkammer mit einem Deckglas verschlossen, am flüssigkeitstemperierten Mikroskoptisch (37 °C) positioniert und ein repräsentatives Gesichtsfeld ausgewählt. Um etwa 200 - 300 Zellen pro Gesichtsfeld auf ihr Fluoreszenzverhalten bei Temperaturenniedrigung von 37 °C auf 4 °C untersuchen zu können und damit eine repräsentative Anzahl von Zellen, wurde hier das Objektiv 20x LD-Achroplan 0.4 Ph2 eingesetzt. Im Abstand von 10 Minuten wurden zwei bis drei Aufnahmen von der intramitochondrialen Fluoreszenz unter physiologischer Temperatur angefertigt, danach die Temperatur am Mikroskoptisch durch Umschalten auf den auf 4 °C vorgekühlten Kryostaten erniedrigt und die intrazelluläre Fluoreszenzintensität in Zeitintervallen von zehn Minuten aufgezeichnet. Nach fünf bis zehn Minuten war im Zellüberstand eine Temperatur von 4 °C erreicht. Für jeden Messzeitpunkt wurde das Gesichtsfeld auf Objektbewegungen überprüft und bei Bedarf manuell repositioniert. Nach 150 bis 180 Minuten wurden die Fluoreszenzmessungen beendet und unter analogen Bedingungen bzw. identischen Geräteeinstellungen der zweite Farbstoff in Zellen der gleichen Zellpräparation untersucht. Die Reihenfolge der vermessenen Farbstoffe wurde an den verschiedenen Versuchstagen variiert. Zur Auswertung wurde auch hier die mittlere intramitochondriale Indikatorfluoreszenz des gewählten Bildausschnittes nach Abzug des Leerwertes (Hintergrundfluoreszenz) bestimmt.

11.12 Untersuchungen zur Zellvitalität

Wie bereits erwähnt, wurde die Aufnahme des DNA-interkalierenden Propidiumiodids (5.00 µg/mL Endkonzentration im Zellüberstand) zur Bestimmung der Zellvitalität während der Fluoreszenzmessungen zur quantitativen Eisenbestimmung eingesetzt. Bei Verlust der Zellvitalität konnten die Zellkerne durch rote Propidiumiodid-fluoreszenz ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

^Y Bei Temperaturenniedrigung auf 4 °C findet eine pH-Wert-Verschiebung in den basischen Bereich auf 7.35 statt.



Propidiumiodid

11.13 Quantenausbeutebestimmung

Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute wurden Lösungen der Fluoreszenzindikatoren **11** und **17** bzw. der Referenz **29** (jeweils 5.00 μM) in Chelex-behandeltem, „einfachem“ Medium sowie die als Standard verwendete freie Base des Rhodamin B (1.00 μM) in absolutem Ethanol sowohl UV/Vis- als auch fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die Fluoreszenzspektren wurden für alle Fluoreszenzfarbstoffe unter identischen Geräteeinstellungen (Korrekturfunktion für das Emissionsspektrum, Integrationszeit) aufgenommen.

11.14 Statistische Auswertung

Alle zellulären Experimente wurden mit Zellen aus mindestens drei unterschiedlichen Zellpräparationen bzw. unterschiedlichen Subkulturen durchgeführt. Experimente im zellfreien System wurden mindestens einmal wiederholt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Die dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und die in den Abbildungen gezeigten Kurvenverläufe sind repräsentativ für alle entsprechend durchgeführten Versuche.

11.15 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrospray Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
FAB	Fast atom Bombardement
FAD/FADH ₂	Flavinadenin-dinucleotid bzw. seine reduzierte Form
FL-DFO	<i>N</i> -(Fluoreszein-5-thiocarbamoyl)-desferrioxamin
FMN	Flavin-mono-nucleotid bzw. Riboflavin-5'-phosphat
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i> (Hanks' gepufferte Salzlösung)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (hochaufgelöste Flüssigchromatographie)
HR-MS	<i>High Resolution mass spectrometry</i> (hochaufgelöste Massenspektrometrie)
HSAB	<i>hard and soft acids and bases</i> (harte und weiche Säuren und Basen)
IRE	<i>Iron Responsive Elements</i> (eisenregulierende Elemente)
IRP	<i>Iron Regulatory Proteins</i> (eisenbindende Proteine)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
mtDNA	mitochondriale DNA
NAD(P)H + H ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NBD-DFO	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-desferrioxamin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle

PIH	Pyridoxalisonicotinoylhydrazon
ppm	<i>parts per million</i> (Anteil pro 100000)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SIH	Salicylaldehydisonicotinoylhydrazon
SOD	Superoxiddismutase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
YFH	Yeast Frataxin Homologue (Frataxin-Homologes in Hefen)

12 LITERATUR

- [1] R. Crichton, *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, 2. Auflage, John Wiley & Sons, LTD, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapur, Toronto **2001**, S. xvii.
- [2] C. M. Lindner, M. Mulligan, D. Henley, in: *Structure and Functions of Iron Storage and Transport Proteins* (I. Urushizaki, ed.), Elsevier Science Amsterdam **1983**, S. 465.
- [3] J. D. Gower, G. Healing, C. J. Green, *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 126-130.
- [4] R. Baliga, N. Ueda, S. V. Shah, *Biochem. J.* **1993**, *291*, 901-905.
- [5] K. Öllinger, K. Roberg, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23707-23711.
- [6] F. Petrat, U. Rauen, H. de Groot, *Hepatology* **1999**, *29*, 1171-1179.
- [7] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 74-81.
- [8] F. Petrat, H. de Groot, R. Sustmann, U. Rauen, *Biol. Chem* **2002**, *383*, 489-502.
- [9] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 1-85.
- [10] W. Breuer, S. Epsztejn, Z. I. Cabantchik, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24209-24215.
- [11] B. P. Espósito, S. Epsztejn, W. Breuer, Z. I. Cabantchik, *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 1-18.
- [12] D. Wallace, *Ment. Retard. Dev. Disabil.* **2001**, *7*, 158-166.
- [13] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Biochem. J.* **2001**, *356*, 61-69.
- [14] C. W. Olanow, G. W. Arendash, *Curr. Opinion Neurol.* **1994**, *7*, 548-558.
- [15] B. Omar, J. McCord, J. Downey, *Ischemia-reperfusion. Oxidative stress. Oxidants and antioxidants.* (ed. H. Sies) London, Academic Press **1991**, S. 493.
- [16] W. Dröge, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 47-95.
- [17] E. F. Elstner, *Der Sauerstoff*, BI-Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien **1990**, S. 347.
- [18] E. Cadenas, A. Boveris, C. I. Ragan, A. O. M. Stoppani, *Arch. Biochem. Biophys.* **1977**, *180*, 248-257.
- [19] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, *Physiol. Rev.* **1979**, *59*, 527-605.
- [20] G. Löffler, P. E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York **1998**, S. 512.

-
- [21] C. Deby, R. Goutier, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 39, 399-405.
- [22] M. J. Steinbeck, A. U. Khan, M. J. Karnovski, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 15649-15654.
- [23] N. Durán, A. Faljoni, *Biochem. Biophys. Research Comm.* **1978**, 83 (I), 287-294.
- [24] C. S. Foote, in: *Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen* (ed. W. S. Caughey), Academic Press New York **1979**, S. 603.
- [25] siehe Ref. [17], S. 9.
- [26] siehe Ref. [17], S. 7.
- [27] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3. Auflage, Oxford University Press (Clarendon) Oxford **2000**, S. 8.
- [28] C. von Sonntag, H. P. Schuchmann, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1255-1279.
- [29] H. Sies, *Angewandte Chemie* **1986**, 98, 1061-1075.
- [30] W. H. Koppenol, *Free Radical Biol. Med.* **1993**, 15, 645-651.
- [31] W. C. Bray, M. H. Gorin, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, 54, 2124-2125.
- [32] M. L. Kremer, *J. Phys. Chem.* **2003**, 107, 1734-1741.
- [33] A. Rigo, R. Stevenato, A. Finazzi-Agro, G. Rotilio, *FEBS-Letters* **1977**, 80(I), 130-132.
- [34] C. Ferradini, J. Foos, C. Houée, J. Pucheault, *Photochem. Photobiol.* **1978**, 28, 697-700.
- [35] W. H. Melhuish, H. C. Sutton, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 970-971.
- [36] J. Weinstein, B. H. J. Bielski, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 58-62.
- [37] H. C. Sutton, G. F. Vile, C. C. Winterbourn, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, 256, 462-471.
- [38] S. D. Aust, L. A. Morehouse, C. E. Thomas, *Free Rad. Biol. Med.* **1985**, 1, 3-10.
- [39] U. Rauen, B. Polzar, H. Stephan, H. G. Mannherz, H. de Groot, *FASEB J.* **1999**, 13, 155-168.
- [40] U. Rauen, F. Petrat, T. Li, H. de Groot, *FASEB J.* **2000**, 14, 1953-1964.
- [41] G. Wächtershäuser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 200-204.
- [42] E. Blöchl, M. Keller, G. Wächtershäuser, K. O. Stetter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 8117-8120.
- [43] C. Huber, G. Wächtershäuser, *Science* **1997**, 276, 245-247.

- [44] L. G. Sillen, *Stability Constants of Metal-ion-complexes Suppl. No. 1, Part I Inorganic ligands*, Alden Press Oxford **1971**, S. 22.
- [45] H. Boukhalfa, A. L. Crumbliss, *Biometals* **2002**, 15, 325-339.
- [46] H. Tapiero, L. Gate, K. D. Tew, *Biomed. Pharmacother.* **2001**, 55, 324-332.
- [47] J. L. Pierre, M. Fontecave, R. R. Crichton, *Biometals* **2002**, 15, 341-346.
- [48] *Roche-Lexikon Medizin Version 4.0*, 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag München **1999**.
- [49] J.-B. Galey, *Adv. Pharmacol.* **1997**, 38, 167-203.
- [50] A. Dautry-Varsat, A. Ciechanover, H. F. Lodish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 2258-2262.
- [51] R. D. Klausner, G. Ashwell, J. van Renswoude, J. B. Harford, K. R. Bridges, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 2263-2266.
- [52] E. H. Morgan, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 762, 498-502.
- [53] P. Ponka, C. N. Lok, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **1999**, 31, 1111-1137.
- [54] W. Breuer, S. Epsztejn, P. Millgram, I. Z. Cabantchik, *Am. J. Physiol.* **1995**, 268, C1354-C1361.
- [55] D. M. de Silva, C. C. Aswith, J. Kaplan, *Physiol. Rev.* **1996**, 76, 31-47.
- [56] W. Forth, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Hrsg. W. Forth, D. Henschler, W. Rummel), Bibliographisches Institut Mannheim, Wien, Zürich **1983**, S. 414.
- [57] C. Garcia-Ruiz, A. Morales, A. Colell, A. Ballista, J. Rodes, N. Kaplowitz, J. C. Fernandez-Checa, *Hepatology* **1995**, 21, 207-214.
- [58] D. A. Brown, K. M. Herlihy, S. K. O'Shea, *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 5198-5202.
- [59] M.-S. Pyon, R. J. Cherry, A. J. Bjornsen, D. C. Zapien, *Langmuir* **1999**, 15, 7040-7046.
- [60] P. Arioso, S. Levi, *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, 33, 457-463.
- [61] A. Treffry, Z. Zhao, M. A. Quail, J. R. Guest, P. M. Harrison, *Biochemistry* **1997**, 36, 432-441.
- [62] T. von Zglinicki, U. T. Brunk, *Z. Gerontol.* **1993**, 26, 215-220.
- [63] siehe Ref. [20], S. 632.
- [64] siehe Ref. [20], S. 189.
- [65] A. Berkaloﬀ, J. Bourguet, P. Farvard, N. Farvard, J.-C. Lacroix, *Die Zelle - Biologie und Physiologie*, Vieweg-Verlag Braunschweig **1990**, S. 265.
- [66] A. L. Lehninger, *Biochemie*, 2. Auflage, VCH-Verlag Weinheim **1987**, S. 363.

-
- [67] siehe Ref. [26], S. 31.
- [68] A. H. V. Schapira, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1410, 99-102.
- [69] A. H. V. Schapira, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1410, 159-170.
- [70] H. Puccio, D. Simon, M. Cossée, P. Criqui-Filipe, F. Tiziano, J. Melki, C. Hindelang, R. Matyas, P. Rustin, M. Koenig, *Nat. Genet.* **2001**, 27, 181-186.
- [71] M. Babcock, D. de Silva, R. Oaks, S. Davis-Kaplan, S. Jiralerspong, L. Montermini, M. Pandolfo, J. Kaplan, *Science* **1997**, 276, 1709-1712.
- [72] D. C. Radisky, M. C. Babcock, J. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 4497-4499.
- [73] D. R. Richardson, C. Mouralian, P. Ponka, E. Becker, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1536, 133-140.
- [74] M. Vorgerd, L. Schöls, C. Hardt, M. Ristow, J. T. Epplen, J. Zange, *Neuromuscular Disorders* **2000**, 10, 430-435.
- [75] J. J. Lemasters, A.-L. Nieminen, T. Qian, L. C. Trost, S. P. Elmore, Y. Nishimura, R. A. Crowe, W. E. Cascio, C. A. Bradham, D. A. Brenner, B. Herman, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1366, 177-196.
- [76] A. E. Vercesi, A. J. Kowaltowski, M. T. Grijalba, A. R. Meinicke, R. F. Castilho, *Bioscience Reports* **1997**, 17, 43-52.
- [77] A. J. Kowaltowski, A. E. Vercesi, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26, 463-471.
- [78] G. Kroemer, B. Dallaporta, M. Resche-Rigon, *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, 60, 619-642.
- [79] D. Y. Yegorov, A. V. Kozlov, O. A. Azizova, Y. A. Vladimirov, *Free Rad. Biol. Med.* **1993**, 15, 565-574.
- [80] P. Nielsen, J. Düllmann, U. Wulfhekel, H. C. Heinrich, *Int. J. Biochem.* **1993**, 25, 223-232.
- [81] J. M. C. Gutteridge, D. A. Rowley, B. Halliwell, *Biochem. J.* **1981**, 199, 263-265.
- [82] J. M. C. Gutteridge, Y. Hou, *Free Radic. Res. Commun.* **1986**, 2, 143-151.
- [83] siehe Ref. [1], S. 7.
- [84] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie, Eine Einführung*, 2. Auflage Wiley-VCH, Weinheim **2000**, S. 203.
- [85] A. Mayer, S. Neuenhofer, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1097-1126.
- [86] siehe Ref. [84], S. 191.
- [87] P. R. Selvin, *Methods Enzymol.* **1995**, 246, 300-334.

- [88] R. D. Alexander, D. H. Buisson, A. W. L. Dudeney, R. J. Irving, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1978**, 74, 1081-1088.
- [89] G. Anderegg, *Helv. Chim. Acta* **1963**, 46, 2397-2410.
- [90] L. M. Wis Vitolo, G. T. Hefter, B. W. Clare, J. Webb, *Inorganica Chimica Acta* **1990**, 170, 171-176
- [91] Z. I. Cabantchik, H. Glickstein, P. Milgram, W. Breuer, *Anal. Biochem.* **1996**, 233, 221-227.
- [92] S. Epsztejn, O. Kakhlon, H. Glickstein, W. Breuer, Z. I. Cabantchik, *Anal. Biochem.* **1997**, 248, 31-40.
- [93] S. D. Lytton, B. Mester, J. Libman, A. Shanzer, Z. I. Cabantchik, *Anal. Biochem.* **1992**, 205, 326-333.
- [94] R. P. Haughland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 6. Auflage, Molecular Probes Inc., Eugene, OR **1996**, S. 533.
- [95] S. Singh, H. Khodr, M. I. Taylor, R. C. Hider, *Biochem. Soc. Symp.* **1993**, 61, 127-137.
- [96] V. C. Chiu, D. H. Haynes, *Biophys. J.* **1977**, 18, 3-22.
- [97] R. M. Smith, A. E. Martell, *Critical Stability Constants Vol. 1-6*, Plenum Press London **1974-1989**.
- [98] D. Ceccarelli, D. Gallesi, F. Giovannini, M. Ferrali, A. Masini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 209, 53-59.
- [99] T. Flatmark, A. Tangeras, *Proteins of iron metabolism* (eds. E. B. Brown, P. Aisen, J. Fielding, R. R. Crichton), Grune & Stratton, New York **1976**, S. 349.
- [100] A. Tangeras, T. Flatmark, D. Bäckström, A. Ehrenberg, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 589, 162-175.
- [101] A. E. Martell, W. F. Anderson, D. G. Badman, *Development of Iron Chelators for Clinical Use*, Elsevier, Amsterdam **1981**.
- [102] A. E. Martell, R. M. Smith, R. J. Motekaitis, *Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database Version 5.0*, Texas A & M University, USA **1998**.
- [103] S. Chaberek, A. E. Martell, *Organic Sequestering Agents*, John Wiley, New York **1959**.
- [104] R. E. Hamm, C. M. Shull, Jr., D. M. Grant, *J. Am. Hem. Soc.* **1954**, 76, 2111-2114.
- [105] A. Albert, *Biochem. J.* **1952**, 50, 690-697.

- [106] D. R. Williams, *J. Chem. Soc. (A)* **1970**, 1550-1555.
- [107] A. Albert, *Biochem. J.* **1950**, 47, 531-538.
- [108] I. Fleming, *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*, 2. Nachdruck der 1. Auflage, VCH-Verlag Weinheim **1990**.
- [109] G. Anderegg, E. Hubmann, N. G. Podder, F. Wenk, *Helv. Chim. Acta* **1977**, 60, 123-140.
- [110] D. A. Hinckley, P. G. Seybold, D. P. Borris, *Spectrochimica Acta* **1986**, 42A, 747-754.
- [111] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products CD supplement*, 9. Auflage, Molecular Probes, Inc., Eugene **2002**, Product Information Sheets MP 06501.
- [112] siehe Ref. [111], Handbook S. 57.
- [113] G. F. Smith, F. W. Cagle Jr., *J. Org. Chem.* **1947**, 30, 781-784.
- [114] P. Lecomte, A. Kirsch-de Mesmaeker, *J. Chem Soc. Faraday Trans.* **1993**, 89, 3261-3269.
- [115] D. Solas, R. Hale, D. Patel, *J. Org. Chem.* **1996**, 1537-1539.
- [116] D. B. Moran, G. O. Morton, J. D. Albright, *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, 23, 1071-1077.
- [117] R. A. Jones, B. D. Roney, W. H. Sasse, K. O. Wade, *J. Chem. Soc. (B)* **1967**, 106-111.
- [118] M. Sprecher, R. Breslow, O. Uziel, T. M. Link, *Org. Prep. Proced. Int.* **1994**, 26, 696-701.
- [119] Y. Aoyagi, R. Asakura, N. Kondoh, R. Yamamoto, T. Kuromatsu, A. Shimura, A. Ohta, *Synthesis* **1996**, 8, 970-974.
- [120] V. Janout, M. Lanier, S. L. Regen, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 1107-1108.
- [121] L. A. Carpino, S. A. Triolo, R. A. Berglund, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3303-3310.
- [122] D. Benson, R. Valentekovich, S.-W. Tam, F. Diederich, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2034-2060.
- [123] M. Adamczyk, J. Grote, *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, 33, 95-100.
- [124] P. J. Evans, B. Halliwell, *Methods Enzymol.* **1994**, 233, 82-92.
- [125] P. Banerjee, J. B. Joo, J. T. Busse, G. Dawson, *Chem. Phys. Lipids* **1995**, 77, 65-78.

- [126] M. Zander, *Fluorimetrie*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York **1981**, S. 77.
- [127] F. Petrat, *Untersuchungen zum chelatisierbaren Eisenpool kultivierter Zellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen*, Dissertation Essen **2000**, S. 31.
- [128] E. A. López-Beltran, M. J. Maté, S. Cerdáns, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 10648-10653.
- [129] siehe Ref. [111], Product Information sheet: Probes for Yeast Mitochondria, S. 2.
- [130] siehe Ref. [111], Handbook s. 604.
- [131] I. Lehnen-Beyel, H. de Groot, U. Rauen, *Biochem. J.* **2002**, 368, 517-526.
- [132] F. Petrat, D. Weisheit, M. Lensen, H. de Groot, R. Sustmann, U. Rauen, *Biochem. J.* **2002**, 362, 137-147.
- [133] B. H. Novak, T. D. Lash, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3998-4010.
- [134] M. J. S. Dewar, T. Mole, *J. Chem. Soc.* **1956**, 2556-2557.
- [135] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley-Interscience, London **1970**, S. 110.
- [136] A. L. Lehninger, *Biochemie*, 2. Auflage, VCH-Verlag Weinheim **1987**, 505-506.
- [137] D. F. Eaton, *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **1988**, 2, 523-531.
- [138] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 82. Auflage, CRC Press Boca Raton FLD **2001-2002**.
- [139] U. Rauen, U. Kerkweg, D. Weisheit, F. Petrat, R. Sustmann, H. de Groot, Publikation in Vorbereitung.
- [140] H. Brockmann, H. Schodder, *Chem. Ber.* **1941**, 74 B, 73-76.
- [141] S. Herzog, J. Dehnert, *Z. Chem.* **1964**, 4, 1-11.
- [142] D. D. Tyler, *The mitochondrion in health and disease*, VCH-Verlag New York **1992**.
- [143] D. Ceccarelli, D. Gallesi, F. Giovannini, M. Ferrali, A. Masini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 209, 53-59.
- [144] P. Costantini, B. V. Chernyak, V. Petronilli, P. Bernardi, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6746-6751.
- [145] G. T. Vatassery, W. E. Smith, H. T. Quach, J. C. K. Lai, *Neurochem. Int.* **1995**, 26, 527-535.
- [146] P. J. Evans, B. Halliwell, *Methods Enzymol.* **1994**, 233, 82-92.

- [147] H. de Groot, M. Brecht, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1991**, 372, 35-41.
- [148] U. Rauen, M. Hanßen, W. Lauchart, H. D. Becker, H. de Groot, *Transplantation* **1993**, 55, 469-473.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Daniela Weisheit
Geburtsdatum und -ort: 22.08.1973 in Eisenach/Thüringen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Anschrift: Loreleiring 10, 65197 Wiesbaden

AUSBILDUNG

9/1980 - 11/1989 Richard-Staimer-Oberschule Marksuhl/Thüringen
11/1989 - 7/1990 Anne-Frank-Gymnasium Aachen
9/1990 - 6/1993 Oberstufengymnasium Eschwege
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1993 - 12/1998 Studium Chemie DII Universität Essen
10/1995 Diplom-Vorprüfung
12/1998 Diplom-Hauptprüfung
2/1999 - 9/1999 Diplomarbeit im Fach Organische Chemie unter Anleitung von Prof. Dr. R. Sustmann
Thema: Entwicklung von Sonden zum Nachweis freier Radikale in biologischen Systemen
10/1999 Beginn der Promotion zum Dr. rer. nat.
Thema: Fluoreszenzsonden zum selektiven Nachweis chelatisierbaren Eisens in Mitochondrien vitaler Zellen, Institut für Organische Chemie (Prof. Dr. R. Sustmann) und Institut für Physiologische Chemie (Prof. Dr. H. de Groot) der Universität Duisburg-Essen bzw. des Universitätsklinikums Essen
Tag der Disputation: 18. Juli 2003